



HAL
open science

Rôle de la diversité des micro-organismes sur le fonctionnement des tourbières dans un contexte de changement climatique.

Étienne Richy

► **To cite this version:**

Étienne Richy. Rôle de la diversité des micro-organismes sur le fonctionnement des tourbières dans un contexte de changement climatique.. Biologie cellulaire. Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2021. Français. NNT : 2021PAUU3005 . tel-03685188

HAL Id: tel-03685188

<https://theses.hal.science/tel-03685188>

Submitted on 2 Jun 2022

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.

THÈSE

UNIVERSITE DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR
École doctorale Sciences Exactes et leurs Applications

Présentée et soutenue le 29 mars 2021

par **Etienne RICHY**

pour obtenir le grade de docteur
de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour
**Spécialité : Physiologie et Biologie des Organismes – Populations -
Interactions**

Caractérisation des communautés microbiennes
procaryotes des tourbières pyrénéennes : diversité,
distribution et rôle fonctionnel

MEMBRES DU JURY

RAPPORTEURS

- Purification LOPEZ-GARCIA Directeur de Recherche CNRS / Université Paris-Saclay
- Edward MITCHELL Professeur / Université de Neuchâtel (Suisse)

EXAMINATEURS

- Laure Gandois Chargée de Recherche CNRS / Laboratoire écologie fonctionnelle et environnement (Toulouse)
- Nathalie FROMIN Chargée de Recherche / Centre d'Écologie Fonctionnelle et Évolutive (Montpellier)

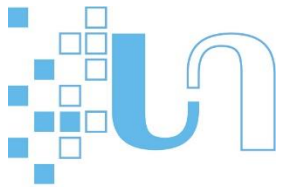
MEMBRE INVITÉ

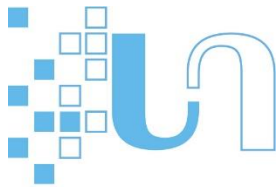
- Francisco Rodriguez VALERA Professeur / Université Miguel Hernández (Espagne)

DIRECTEURS

- Béatrice LAUGA Professeure / Université de Pau et des Pays de l'Adour
- François RIGAL Maître de Conférences / Université de Pau et des Pays de l'Adour







Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au sein de l'équipe CME (Chimie et Microbiologie de l'Environnement) rattaché au laboratoire IPREM (Institut des sciences analytiques et de physico-chimie pour l'environnement et les matériaux). Elle a été financée par la CDABPP (Communauté d'Agglomération Pau Béarn Pyrénées) et l'IPREM, à qui je tiens à témoigner toute ma reconnaissance. Je remercie également les financeurs du projet, le Labex DRIHM via l'OHM (Observatoire Homme Milieu Pyrénées) Haut Vicdessos et Hautes Vallée des gaves, REPLIM (Red Pirenaica de Observatorios de Ecosistemas Vulnerables (Lagos, Turberas) Al Cambio Climático) soutenu par la Communauté Européenne (OPCC et Interreg).

Tout d'abord, je tiens à remercier Purification Lopez-Garcia et Edward Mitchell, d'avoir accepté d'être mes rapporteurs ainsi que Laure Gandois et Nathalie Fromin qui ont accepté d'examiner ma thèse.

Je remercie chaleureusement Béatrice Lauga, ma directrice de thèse et François Rigal, mon co-directeur de thèse, pour leur confiance qu'ils m'ont accordé depuis le début, pour leurs soutiens, pour tout leur savoir et la rigueur scientifique qu'ils m'ont transmis durant ces trois années de thèse. Je garderai un très bon souvenir de nos campagnes de prélèvement, sous le soleil de Bernadouze comme sous la pluie... « *on the road again, again* ».

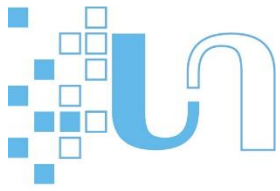
Je remercie tout particulièrement Francisco Rodriguez-Valera et le laboratoire EGG (Evolutionary Genomic Group) de l'Université Miguel Hernandez basé à Elche (Espagne) pour m'avoir accueilli pendant 9 mois, et plus particulièrement Pedro J. Cabello Yeves et Felipe Hernandes Couthino, pour m'avoir enseigné l'art de la métagénomique.

Je remercie une nouvelle fois Laure Gandois ainsi que toute l'équipe du laboratoire ECOLAB (Laboratoire écologie fonctionnelle et environnement) pour leurs conseils avisés sur les tourbières et le près du matériel de prélèvement.

Je remercie Alice Balby, la technicienne de laboratoire qui nous a accompagnés sur le terrain, et qui m'a été d'une grande aide pour la préparation des échantillons, j'espère que le broyage ne t'aura pas laissé un trop de mauvais souvenir ;)

Je remercie aussi Vincent Jassey pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire ECOLAB et m'avoir aidé à mettre en place des protocoles pour les mesures d'activités enzymatiques.

Je remercie le personnel technique du laboratoire IBEAS pour leurs précieux conseils. Je remercie chaleureusement l'équipe du Pôle Applications Scientifiques de la Direction du Numérique, et tout particulièrement Marc Odunlami et Vincent Le Bris, pour m'avoir épaulé à de nombreuses reprises. Le travail que vous faites sur Pyrene est remarquable et vous m'avez été d'une grande aide, merci beaucoup.



Je remercie tous les doctorants de l'équipe CME, de l'IPREM et d'ailleurs, qui ont participé à rendre ma vie agréable à Pau.

Enfin, je tiens à remercier tout particulièrement ma famille, qui a été présente dans les différentes étapes de ma vie, et qui m'a toujours soutenu dans les choix que j'ai faits.

Merci à tous.

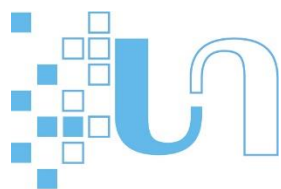
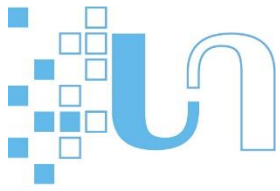
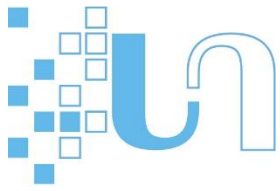


Table des matières

REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIERES	5
TABLE DES ILLUSTRATIONS	8
TABLE DES TABLEAUX	11
PARTIE I. INTRODUCTION GENERALE	12
PARTIE II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	16
II.1. LA TOURBIÈRE, UN ECOSYÈME SINGULIER	16
II.1.1. <i>Formation et distribution des tourbières</i>	16
II.1.2. <i>Classification et caractéristiques générales</i>	18
II.1.3. <i>La sphaigne : l'espèce ingénieuse des tourbières</i>	21
II.1.4. <i>Le rôle des tourbières dans le cycle du carbone</i>	23
II.1.5. <i>Les tourbières et le changement climatique</i>	23
II.2. LA DÉCOMPOSITION DE LA MATIÈRE ORGANIQUE DANS LES TOURBIÈRES	24
II.2.1. <i>Le rôle du métabolisme microbien</i>	24
II.2.2. <i>Le rôle des sphaignes</i>	27
II.3. LA DIVERSITÉ MICROBIENNE DES TOURBIÈRES	28
II.3.1. <i>Les activités des microorganismes dans le fonctionnement des tourbières</i>	29
II.3.2. <i>État des lieux non-exhaustif de la diversité taxonomique des microorganismes dans les tourbières</i>	30
II.3.3. <i>Rôle de l'environnement abiotique sur la structure des communautés microbienne des tourbières : quels sont les principaux facteurs ?</i>	36
II.4. LE CAS DES TOURBIÈRES PYRÉNÉENNES	36
II.5. OBJECTIFS DE LA THÈSE	39
II.6. STRUCTURE DU DOCUMENT	40
PARTIE III. MATÉRIELS ET MÉTHODES	41
III.1. DESCRIPTION DE L'ÉCHANTILLONNAGE DES TOURBIÈRES DE L'ÉTAGE ALPIN LOCALISÉES EN ESPAGNE ET EN ANDORRE.....	41
III.1.1. <i>Localisation géographique des tourbières</i>	41
III.1.2. <i>Présentation de la tourbière de l'Encenrera (Andorre) et prélèvement de tourbe</i>	42
III.1.3. <i>Présentation de la tourbière du Clots de l'Estanyo (Andorre) et prélèvement de tourbe</i>	43
III.1.4. <i>Présentation de la tourbière d'Aigüestortes (Espagne) et prélèvement de tourbe</i>	44
III.1.5. <i>Protocole de découpe des carottes de tourbe</i>	45
III.2. DESCRIPTION DE LA TOURBIÈRE DE BERNADOUZE (FRANCE) ET PRÉLEVEMENTS DE TOURBE	47
III.3. CARACTÉRISATION DES PARAMÈTRES PHYSICO-CHIMIQUES	51
III.3.1. <i>Mesure des paramètres géochimiques dans les tourbières d'Andorre et d'Espagne</i>	51
III.3.2. <i>Mesure des paramètres géochimiques dans la tourbière de Bernadouze</i>	51
III.3.3. <i>Extraction du phénol et des phénols libres</i>	52
III.3.4. <i>Estimation de l'espace disponible pour l'oxygène</i>	53
III.3.5. <i>Activités enzymatiques</i>	54



III.4. SEQUENÇAGE D'AMPLICONS 16S rRNA: ANALYSES MOLECULAIRES ET TRAITEMENT BIOINFORMATIQUE	55
III.4.1. Présentation du séquençage du gène codant l'ARNr 16S.....	56
III.4.2. Extraction de l'ADN, amplification PCR et séquençage	56
III.4.3. Classification taxonomique et arbre phylogénétique.....	56
III.4.4. Prédiction des capacités métaboliques.....	57
III.5. SEQUENÇAGE METAGENOMIQUE NON-CIBLEE : ANALYSES MOLECULAIRES ET TRAITEMENT BIOINFORMATIQUE	57
III.5.1. Les limites du séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S	57
III.5.2. Les technologies de séquençage de seconde et troisième générations (NGS)	58
III.5.3. Séquençage et assemblage.....	59
III.5.4. Analyse des séquences.....	60
III.5.5. Assemblage des génomes et estimation de la qualité.....	60
III.5.6. Annotation des génomes.....	60
PARTIE IV. DESCRIPTION A HAUTE RESOLUTION DE LA DIVERSITE ET DE LA FONCTIONNALITE PREDITE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES LE LONG DE PROFILS DE TOURBE DANS TROIS TOURBIERES D'ALTITUDE DES PYRENEES	63
IV.1. INTRODUCTION.....	65
IV.2. MATERIALS AND METHODS	67
IV.3. RESULTS	72
IV.4. DISCUSSION	83
IV.5. CONCLUSION	88
IV.6. REFERENCES	91
PARTIE V. L'INFLUENCE DE L'HETEROGENEITE ENVIRONNEMENTALE DANS LES VARIATIONS DE LA DIVERSITE ET DE LA COMPOSITION DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DANS UNE TOURBIERE DE MONTAGNE	104
V.1. INTRODUCTION.....	106
V.2. MATERIALS AND METHODS	108
V.3. RESULTS	117
V.4. DISCUSSION	131
V.5. CONCLUSION	134
V.6. REFERENCES	136
PARTIE VI. UNE APPROCHE GENOME-CENTREE ET UN RESEAU DE COOCCURRENCE REVELENT LE ROLE DES BACTERIES ET DES ARCHEES DANS LA DEGRADATION DE LA MATIERE ORGANIQUE DANS UNE TOURBIERE PYRENEENNE (BERNADOUZE, FRANCE)	143
VI.1. INTRODUCTION.....	145
VI.2. MATERIALS AND METHODS	147
VI.3. RESULTS AND DISCUSSION	152
VI.4. CONCLUSION	166
VI.5. REFERENCES	167
PARTIE VII. DISCUSSION GENERALE	204
VII.1. LA DIVERSITE DES MICROORGANISMES DANS LES TOURBIERES PYRENEENNES	204



VII.2. L'INFLUENCE DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES SUR LA DIVERSITE MICROBIENNE DANS LES TOURBIERES PYRENEENNES.....	205
VII.3. L'INFLUENCE DE LA SAISON SUR LES MICROORGANISMES DES TOURBIERES	207
VII.4. ACIDOBACTERIA, LES DEGRADEURS PRIMAIRES DE POLYSACCHARIDES A BERNADOUZE ?.....	209
VII.5. MODELE CONCEPTUEL DU ROLE DES MICROORGANISMES DANS LE CYCLE DU CARBONE DE LA TOURBIERE DE BERNADOUZE	213
VII.6. LA METHANOGENESE DANS LES TOURBIERES PYRENEENNES	215
VII.7. PARTENARIAT HOTE-NANOARCHAEOTA ETUDIE PAR APPROCHE GENOMIQUE	217
CONCLUSION GENERALE.....	221
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	224

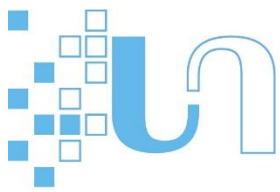


Table des illustrations

Figure I.1. Photographies des trois micro-habitats communément observés dans les tourbières.	12
Figure I.2. Classification des différents types de services écosystémiques assurés par les tourbières (informations rassemblées à partir du site www.pole-tourbieres.org).....	13
Figure II.1. Schéma représentant les différentes étapes de formation d'une tourbière de type ombrotrophe.....	17
Figure II.2. Répartition mondiale des tourbières.....	18
Figure II.3. Exemple de quelques caractéristiques typiques de l'acrotelm et du catotelm dans une tourbière ombrotrophe (d'après Gobat et al., 1998).....	19
Figure II.4. Schéma représentatif des 3 microhabitats d'une tourbière : butte (hummock), platière (lawn) et dépression (hollow).....	20
Figure II.5. Exemple de photographie de <i>Sphagnum</i> spp.	21
Figure II.6. Schéma des différents processus influençant la formation de la tourbe.	22
Figure II.7. Schéma conceptuel de la dégradation des débris végétaux en monomères.	25
Figure II.8. Séquence thermodynamique pour la réduction des substances inorganiques par les microorganismes.	26
Figure II.9. Exemple de quatre tourbières pyrénéennes.	38
Figure III.1. Localisation géographique des tourbières.	42
Figure III.2. La tourbière de l'Encenrera (altitude 2365 m), Andorre.	43
Figure III.3. La tourbière du Clots de l'Estanyo (altitude 2575 m), Andorre.....	44
Figure III.4. La tourbière d'Aigüestortes (altitude 2300 m), Espagne.	45
Figure III.5. Carottes prélevées dans les tourbières d'Andorre et d'Espagne.	46
Figure III.6. Étapes de préparation des échantillons.....	47
Figure III.7. La tourbière de Bernadouze (altitude 1345m), France.	48
Figure III.8. La tourbière de Bernadouze au cours des quatre campagnes de prélèvement.	49
Figure III.9. Carottiers utilisés pour collecter les échantillons.	50
Figure III.10. Unité de filtration utilisée pour filtrer les échantillons de tourbe.....	52
Figure III.11. Mesure des activités enzymatiques.....	55
Figure III.12. Schéma récapitulant les étapes nécessaires à l'assemblage de génomes.	59
Figure IV.1. Location of the three peatlands sampled in the study.....	69
Figure IV.2 Physical and chemical characterization for the three sampled peatlands.....	73
Figure IV.3. DNA-derived microbial community composition and diversity across the depth gradient in the three sampled peatlands.	76

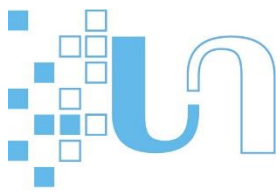


Figure IV.4. Correlations between environmental variables and alpha (A) and beta (B) diversity after accounting for the effect of depth.....	78
Figure IV.5. Two-dimensional ordination solution using non-metric multidimensional scaling (NMDS) based on the dissimilarity in ASV (A), phylum (B), phylogenetic (C) and functional (D) composition between all pairs of samples across the three peat cores.	79
Figure IV.6. Heatmap of the normalized (Z-score) mean abundance of the 30 selected metabolic pathways in the 6 conditions tested (Above or below the water table vs the three peat cores) in the Indicator values (IndVal) analyses.	82
Figure IV.7. Physical and chemical characterization for the two additional cores AYG2 and CEST2 collected in the peatlands Aigüestortes and Clots de l'Estany respectively.....	98
Figure IV.8. DNA-derived microbial community composition and diversity across the depth gradient for the two additional cores AYG2 and CEST2 collected in the peatlands Aigüestortes and Clots de l'Estany respectively.	99
Figure IV.9. Variation of the relative abundance of the 14 most abundant taxa at phylum level along the depth gradient, except for the phylum Proteobacteria for which the relative abundance of the 3 major classes (alpha, gamma and delta) are shown.	100
Figure V.1. (A) Location of the peatland on the French Pyrenees and (B) location of five zones (white ellipses) with the three sampled sites per zone marked with white dots and red dots.....	109
Figure V.2. Fluctuations of (A) daily surface temperature and (B) daily temperature at 1 meter depth [dark line = average of three sites (See Figure V.1); grey envelope = standard deviation], (C) respiration (CO ₂ fluxes) (dots = average of 5 measures; error bars = standard errors) and daily level of the water table over our study period (dark line = average of 10 piezometers; grey envelope = standard deviation).....	118
Figure V.3. Results of the analyses of variance testing the effect of campaigns, zones, habitats and depth and all possible two-way interactions on (A) the seven environmental variables and (B) diversity metrics.....	119
Figure V.4. Main sources of variation for the seven environmental variables considered in this study.	120
Figure V.5. Results of the Principal Component Analyses (PCA) conducted on the seven environmental variables considered in this study.....	121
Figure V.6. Barplots of the relative abundance of major phyla (A) and classes (B) present at over 1 % of the samples grouped by zones, depth and habitats.	124
Figure V.7. Main sources of variation for the diversity metrics considered in this study. Only the most important factors identified in Figure V.3 were represented.....	126
Figure V.8. (A) Two-dimensional ordination solution using non-metric multidimensional scaling (NMDS) based on the Bray–Curtis dissimilarity computed between the 180 samples. Dots indicate samples. The stress value of NMDS was 0.11. (B) Procrustes superimposition plots between environment and species composition (9999 permutations), with the input of non-metric multidimensional scaling (NMDS) ordinations calculated from environmental and Bray-Curtis dissimilarity.....	127

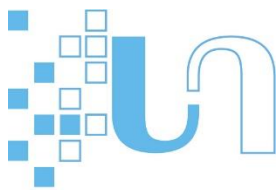


Figure V.9. Results of model-selection procedure for models relating ASV richness, Simpson evenness and Local Contribution to Beta Diversity (LCBD) to environmental variables.	128
Figure V.10. Selected relationships between environmental variables and ASV richness with the effect of pH (A-B), the effect of C:N (C-D) and distance to the water table (E-F).	129
Figure V.11. Results of model-selection procedure for models relating (A) ASV richness, (B) Simpson evenness and (C) Local Contribution to Beta Diversity (LCBD) to environmental variables for (A) Acidobacteria, (B) Proteobacteria, (C) Chloroflexi and (D) Crenarchaeota.	130
Figure VI.1. Study site and sampling procedure.	148
Figure VI.2. Environmental parameters, archaeal and bacterial diversity and influence of variables.	154
Figure VI.3. Maximum likelihood phylogenomic tree of the 290 metagenome-assembled genomes (MAGs).	156
Figure VI.4. Predicted polysaccharides degradation capacity and fermentation metabolisms.	158
Figure VI.5. Co-occurrence MAGs network based on Spearman correlations.	163
Supplementary data Figure VI.6. a) MAGs diversity coverage (calculated from bowtie2 tools and mapping raw read of each metagenome against the 515 MAGs) in function of the specific richness (calculated from 16S rRNA genes recovered in the 24 metagenomes) b) 16S rRNA gene recovered in the Bog, Eutrophic and Oligotrophic Fen summed at phylum level c) sum of the genomes assembled in Bernadouze at phylum level.	173
Supplementary data Figure VI.7. Bog-38 and Methanomicrobiales location in the Archaeal phylogenomic tree.	174
Figure VII.1. Variation saisonnière des paramètres physico-chimiques de Bernadouze.	208
Figure VII.2. Carbohydrate Active enZymes présentes dans les génomes d'Acidobacteria.	211
Figure VII.3. Schéma conceptuel simplifié du fonctionnement dans la tourbière de Bernadouze. ...	215
Figure VII.4. Position de Bog-38 et Methanomicrobiales dans l'arbre phylogénomique des Archées.	217
Figure VII.5. <i>Nanoarchaeum equitans</i> - <i>Ignicoccus</i> sp en co-culture (droite) observées par microscopie électronique et microscopie à fluorescence (Huber et al., 2002). À gauche, distribution des études menées sur les Nanoarchaeota dans différents environnements.	219

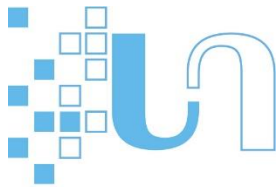


Table des tableaux

Table II-1. Aperçu des recherches menées sur les microorganismes des tourbières au cours des dix dernières années via un séquençage haut débit (16S rRNA).	32
Table IV-1. Geographical and biogeochemical characteristic of the three peat cores analyses in our study.....	72
Table IV-2. Results of the PerMANOVA testing the effect of geographical locations, depth and their interaction in explaining ASV, phylum, phylogenetic and functional (pathways) composition among the three peat cores.	80
Table IV-3. Pearson's correlation between relative abundance of the 14 most abundant taxa at phylum level and the depth gradient, except for the phylum Proteobacteria for which the relative abundance of the 3 major classes (alpha, gamma and delta) are shown.....	101
Table V-1. Overview of the environmental variables considered in this study.....	113
Supplementary data Table VI-1. Main features of the 290 Metagenome Assembled Genomes from Bernadouze.	175

Partie I. Introduction générale

Les tourbières sont des zones humides, régulièrement ou constamment saturées en eau. La matière organique (MO) n'y est que partiellement dégradée dû à la faible oxygénation, et s'accumule lentement en formant la tourbe. Ce sont donc des écosystèmes extrêmement riches en MO, qui abrite une forte diversité de plantes, d'insectes et de microorganismes. Il existe plusieurs types de tourbière, pouvant être classées en fonction de l'hydrologie, des éléments nutritifs et du pH (Wheeler and Proctor, 2000). Les tourbières de type ombrotrophe sont exclusivement alimentées par les précipitations atmosphériques, possèdent de faible concentration en nutriments et des pH acides. Les tourbières minérotrophes reçoivent de l'eau et des nutriments des précipitations ainsi que des eaux souterraines locales, possèdent des pH proches de la neutralité, et pouvant être aussi bien eutrophe (relativement riche en nitrate et phosphate assimilable) qu'oligotrophe (pauvre en éléments nutritifs). Ces caractéristiques sont déterminantes pour la diversité locale (végétale et microbienne inclus), la productivité des plantes et le taux de décomposition de la litière (Belyea, 1996; Bragazza et al., 2007; Bridgham and Richardson, 2002; Clymo et al., 1998; Gorham, 1991). Des microstructures liées au régime d'aération et d'humidité se distinguent dans les tourbières (i.e. butte, platière et gouille, **Figure I.1**) entraînant des variations du couvert végétal. Les espèces caractéristiques des tourbières tempérées et boréales du nord sont des Bryophytes du genre Sphagnum. Dans ces tourbières, la croissance des sphaignes est vitale pour la séquestration et le stockage du carbone, car elles créent efficacement un environnement humide et acide qui empêche, ou du moins ralentit la décomposition (Rydin et al., 2006).



Figure I.1. Photographies des trois micro-habitats communément observés dans les tourbières.

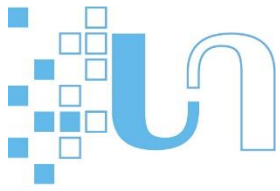
De gauche à droite, butte à sphaigne, platière et gouille.

Les tourbières sont des milieux emblématiques dans de nombreuses régions du monde, distribuées sur de vastes étendues comme en Sibérie ou dans les basses-terres de la baie d'Hudson-James, qu'à plus petite échelle comme dans les environnements montagnards tels que les Pyrénées. Ce sont des réservoirs de biodiversité, offrant de nombreux habitats et abritant des espèces emblématiques telles que des Orchidées ou des plantes insectivores (e.g. genre *Drosera*). Les tourbières rendent également de nombreux services écosystémiques (**Figure I.2**). Elles participent notamment à la régulation de l'hydrologie des bassins-versants, au stockage et au recyclage des nutriments, et à la régulation du climat, aussi bien à l'échelle locale, que régionale et globale (Kimmel and Mander, 2010). En effet, alors qu'elles ne couvrent que 3 % de la surface terrestre mondiale, près de 600 Gt de carbone sont stockées dans les tourbières. Cela représente 21 % du stock de carbone de l'horizon de surface du sol (de 0 à 3 mètres de profondeur) et avoisine la quantité de carbone présent dans l'atmosphère. En parallèle, en émettant chaque année environ 36 Tg CH₄-C, les tourbières sont l'une des plus importantes sources naturelles méthane, un gaz à effet de serre possédant un pouvoir radiatif 34 fois supérieur à celui du dioxyde de carbone (Abdalla et al., 2016).



Figure I.2. Classification des différents types de services écosystémiques assurés par les tourbières (informations rassemblées à partir du site www.pole-tourbieres.org).

Le stockage et le relargage de carbone organique sous forme de CO₂ résultent principalement de l'activité des microorganismes. Les paramètres géochimiques des tourbières tels que la saturation en eau, les pH acides et les faibles concentrations en nutriments inhibent la décomposition de la matière organique d'origine végétale par les microorganismes. Cependant, il s'agit d'écosystèmes sensibles et des

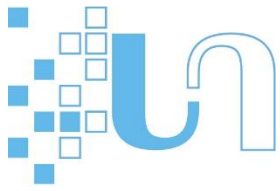


perturbations anthropiques peuvent modifier l'équilibre de ces écosystèmes, contribuant en retour au réchauffement climatique de manière significative.

Pendant plusieurs décennies, les ressources naturelles des tourbières ont été exploitées par l'homme. Parmi les plus destructives, le drainage à finalité agricole, le boisement ou encore l'extraction industrielle de la tourbe utilisée comme combustible, ont entraîné une diminution dramatique de la surface des tourbières à l'échelle mondiale (Manneville et al., 1999), et ces activités anthropiques ont, aujourd'hui encore, un impact sur le climat. Le drainage par exemple, qui induit l'assèchement des tourbières, favorise l'oxydation microbienne de la tourbe, contribuant chaque année à l'émission d'environ 5 % de tous les gaz à effet de serre due à l'activité anthropique sur seulement 0,3% des surfaces terrestres mondiales (Günther et al., 2020). De même, une augmentation des températures et une baisse des précipitations (par exemple, une augmentation de 1,2°C et une diminution des précipitations moyennes de 2,5% ont été enregistrées dans les Pyrénées entre 1949 et 2010 ; source : OPCC1) pourrait également conduire à la diminution de la profondeur de la nappe. Ainsi, bien qu'il soit suggéré que les tourbières pourraient rester des puits de carbone à l'avenir, certains scénarios rapporte que les tourbières pourraient passer de rétroaction climatique négative à positive d'ici la fin du XXIe siècle (Yu et al., 2010).

Les tourbières sont principalement localisées dans l'hémisphère nord (80% dans les zones boréales et subarctiques) et représentent la grande majorité du stock de carbone des tourbières (i.e. 550 Gt) (Yu et al., 2010). Malgré de récents efforts pour caractériser les microorganismes des tourbières du nord couvrant de larges surfaces comme celles de Russie, du Canada et des États-Unis, celles localisées à la limite sud de l'aire de répartition des tourbières du nord sont encore largement inconnues. Bien qu'elles soient de tailles plus modestes et plus clairsemées, ces tourbières permettrait de stocker entre ~1 200 et ~1 500 Mg C ha⁻¹, ce qui correspond au stockage moyen défini pour les tourbières boréales. Les tourbières de montagne pyrénéennes ont la particularité d'être soumise à des conditions climatiques très contrastées. En effet, les écosystèmes pyrénéens sont des milieux pouvant subir une influence océanique ou méditerranéenne, avec des étés chauds et secs ainsi que des hivers extrêmes, avec des chutes de neige et des températures inférieures à 0°C fréquemment enregistrées. Ainsi, ces écosystèmes représentent de bons modèles pour étudier l'influence des variations climatiques sur les microorganismes de ces milieux.

Mon projet de thèse s'inscrit dans le cadre des projets PYRPEAT soutenu par le Labex DRIHM via l'OHM (Observatoire Homme Milieu Pyrénées) Haut Vicdessos et Hautes Vallée des gaves, TORBERA soutenu par la CDAPBP (Communauté d'Agglomération Pau Béarn Pyrénées) et REPLIM (Red Pirenaica de Observatorios de Ecosistemas Vulnerables (Lagos, Turberas) Al Cambio Climático) soutenu par la Communauté Européenne. REPLIM est un projet scientifique transfrontalier qui s'intègre dans une série



d'actions déployées par l'OPCC (Observatoire Pyrénéen du Changement Climatique), visant à mettre en place un réseau de surveillance des lacs et des tourbières localisées dans les Pyrénées. Ce projet a pour but de caractériser l'impact du réchauffement climatique sur ces écosystèmes montagnards emblématique des Pyrénées, vulnérables faces aux différentes pressions anthropiques (<https://www.opcc-ctp.org/fr/replim>). Dans une perspective de conservation, la première étape consiste à établir un état des lieux des sites les plus représentatifs sur l'ensemble de la chaîne.

Durant ma thèse, nous avons donc étudié les communautés microbiennes de quatre tourbières localisées dans les Pyrénées. Nos recherches se sont focalisées autour de trois axes principaux (1) documenter et décrire la diversité microbienne des tourbières Pyrénéennes (distribution et structure des communautés), (2) identifier les paramètres physico-chimiques qui structurent les communautés microbiennes dans ces tourbières (identification des principaux gradients écologiques, variations spatio-temporelles) et (3) analyser les capacités métaboliques des microorganismes et étudier l'influence des paramètres environnementaux sur le potentiel fonctionnel microbien. Ensemble, ces résultats nous permettront d'apporter un éclairage nouveau sur la diversité et rôle des microorganismes dans le fonctionnement des tourbières. Après une synthèse bibliographique (partie 2) et un matériels et méthodes (partie 3), nous présenterons dans une première étude (partie 4) les résultats d'une analyse descriptive de la diversité dans trois tourbières localisées en Espagne et en Andorre. Dans une cinquième partie, nous étudierons l'influence des paramètres physico-chimiques sur les variations spatio-temporelles des communautés microbiennes au sein d'une tourbière, la tourbière de Bernadouze. Enfin, dans une sixième partie, nous analyserons le potentiel fonctionnel des bactéries et des archées de la tourbière de Bernadouze via une approche génome-centrée.

Partie II. Synthèse bibliographique

II.1. La tourbière, un écosystème singulier

Les tourbières sont des écosystèmes naturels singuliers et complexes qui figurent parmi les réservoirs de carbone les plus importants de notre planète. Il existe une remarquable diversité des tourbières à l'échelle mondiale, répartie sur à peu près tous les continents et concentrant une biodiversité originale, riche mais souvent menacée du fait de l'action du changement climatique et de l'utilisation intensive de ces espaces naturels dans certaines régions du globe. Dans cette première partie, nous allons nous attacher à présenter les principales caractéristiques des tourbières (exemple : formation, distribution, gradients écologiques) et exposer le rôle fondamental de certains facteurs dans leur formation et fonctionnement. Pour décrire ces milieux, nous nous appuyerons sur la classification développée en Suède par Du Rietz et élaborée par Sjörs (1948) (voir Rydin et al., 2006). Enfin, nous finirons par rappeler l'importance des tourbières dans le cycle du carbone et les principales menaces que fait peser le réchauffement climatique sur leur devenir et leur fonctionnement.

II.1.1. Formation et distribution des tourbières

Les tourbières sont des milieux humides colonisés par une végétation qui se développe sur un sol peu perméable et formé de tourbe sur une épaisseur de quelques dizaines de centimètres à plusieurs mètres (Manneville et al., 1999). La tourbe est constituée au minimum de 20% de matière organique peu dégradée provenant de l'accumulation de résidus de végétaux au cours du temps. La formation des tourbières actuelles a principalement commencé après le dernier maximum glaciaire (LGM, 21 ka BP), conduisant à l'accumulation de tourbe durant plusieurs milliers d'années, parfois jusqu'à plusieurs mètres de profondeur (Clymo et al., 1998; Turunen et al., 2002). La formation de la tourbe est un processus très lent avec une croissance verticale estimée à 1 à 2 mm/an. En général, la formation des tourbières résulte de deux processus principaux : la terrestrialisation et la paludification. Le processus de la terrestrialisation traduit le comblement progressif d'un plan d'eau par des sédiments et des organismes aquatiques (par exemple des diatomées ou des algues), qui devient de moins en moins profond au cours du temps (Anderson et al., 2003). Par la suite, une végétation associée aux zones humides va venir coloniser la périphérie du système, ce qui va induire un remplissage progressif sur une longue période (**Figure II.1**). La paludification, quant à elle, traduit une accumulation de la tourbe directement sur le dessus du sol minéral en pente, soit de manière synchrone avec la terrestrialisation, soit à la suite de celle-ci (Craft, 2016).

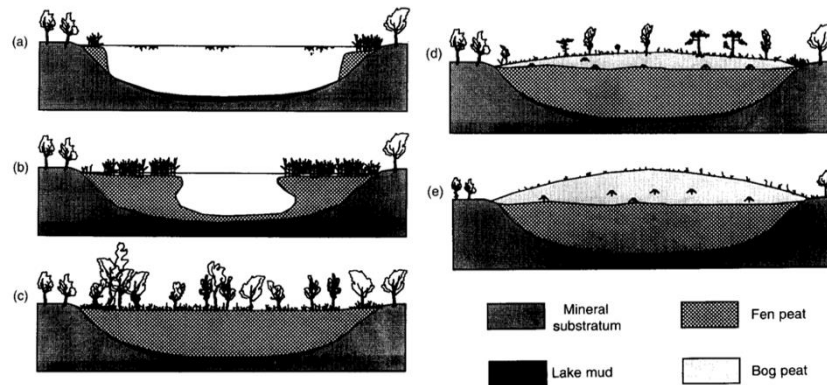


Figure II.1. Schéma représentant les différentes étapes de formation d'une tourbière de type ombrotrophe.

(a)-(b) comblement progressif d'un lac par développement périphérique de plantes. (c) la matière organique s'accumule jusqu'à comblement de l'étendue d'eau originelle (d)-(e) la tourbière se bombe sous la croissance des sphaignes (van Breemen, 1995).

Les tourbières se trouvent principalement dans les régions où les précipitations dépassent le taux d'évapotranspiration (van Breemen, 1995), ce qui entraîne l'établissement de conditions de saturation en eau. Les tourbières ont une large répartition géographique, pouvant être rencontrées aussi bien sous des climats chauds, froids, humides et secs (Craft, 2016). Elles sont cependant majoritairement réparties dans l'hémisphère nord, en Asie (38,4 %) et en Amérique du Nord (31,6 %) et dans une moindre mesure en Europe (12,5 %) et en Amérique du Sud (11,5 %) (Xu et al., 2018) (**Figure II.2**). Selon leur localisation, la tourbe peut être gelée en permanence comme c'est le cas pour les palses (*palsas* en anglais) rencontrés en milieu périglaciaire, mais aussi prendre la forme de forêts marécageuses tourbeuses comme la mangrove, sous les tropiques (Page and Baird, 2016). La superficie totale des tourbières est estimée à 4,632 millions de km², ce qui représente un peu plus de ~3% des terres émergées (Minasny et al., 2019).

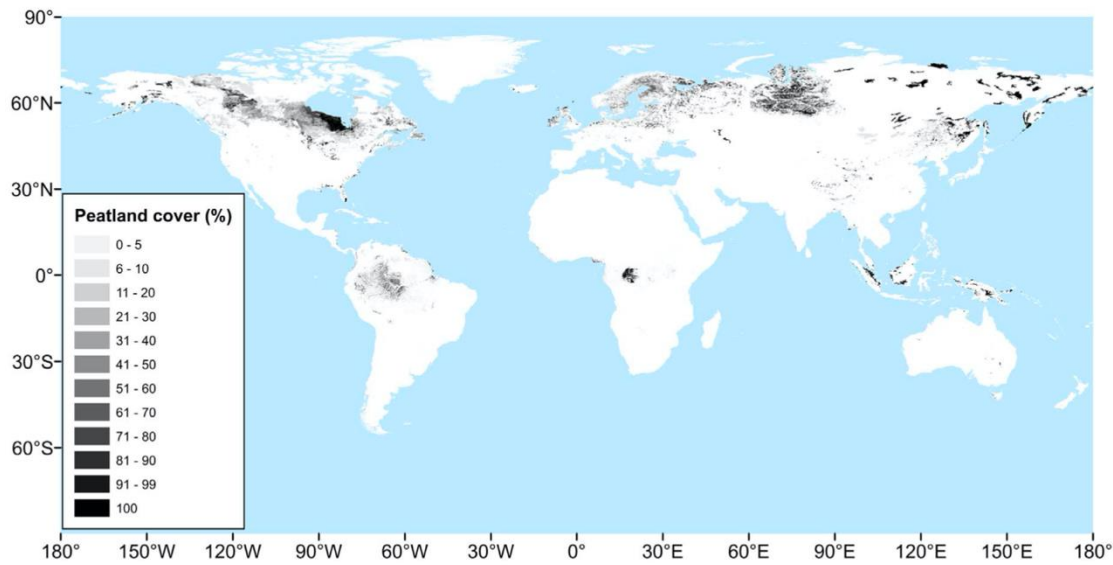


Figure II.2. Répartition mondiale des tourbières.

Carte éditée par (Xu et al., 2018) à partir du projet de collecte de données internationales PEATMAP.

En France, la surface couverte par les tourbières est aujourd'hui estimée à 2875 km² (Tanneberger et al., 2017). Les zones montagneuses françaises renferment également de nombreuses tourbières (e.g. Cubizolle & Thebaud, 2014, Rosset et al., 2019) généralement de petites tailles et couvrant pour la plupart d'entre elles des surfaces inférieures à 1 km².

II.1.2. Classification et caractéristiques générales

L'une des distinctions fondamentales entre les différents types de tourbières ce fait entre les tourbières minérotrophes et les tourbières ombrotrophes. Ces deux types de tourbières ont des communautés végétales, des propriétés hydrologiques et physico-chimiques différentes. Cette distinction est souvent utilisée pour différencier les tourbières à l'échelle régionale, mais ces deux types peuvent également se rencontrer au sein même d'une tourbière, appelé alors tourbière mixte. Les tourbières minérotrophes, également appelées bas-marais (*fens* en anglais), sont fortement connectées aux eaux souterraines et latérales et présentent un pH plutôt neutre, de même qu'un apport élevé en nutriments et une forte abondance de cations (par exemple Ca et Mg). Leur végétation se caractérise principalement par la présence de graminées, de carex et de joncs. En revanche, les tourbières ombrotrophes, également appelées haut-marais (*bogs* en anglais), présentent un taux élevé d'accumulation de matière organique et sont généralement pauvres en nutriments. Étant déconnectées des sources d'eau latérales et souterraines, elles ne reçoivent l'eau que par les précipitations et ont tendance à former des dômes surélevés. Associées

à des conditions acides et anaérobies, elles sont caractérisées par une forte teneur en matière organique et une faible teneur en cations. Les sphaignes dominent la végétation de ces tourbières (Joosten and Clarke, 2002).

Dans le profil vertical de tourbe, se distinguent deux horizons principaux : l'acrotelm et le catotelm (**Figure II.3**). L'acrotelm est la couche supérieure, fibrique, avec un faible degré de décomposition, et relativement poreuse, induisant une conductivité et une circulation de l'eau élevée. Cet horizon est soumis à de fortes variations de la nappe avec des plantes sur la surface et une dominance de bactéries aérobies dans la tourbe (**Figure II.3**). Situé sous l'acrotelm, le catotelm est une couche gorgée d'eau en permanence, saprique, avec un degré élevé de décomposition et fortement humifiée. La conductivité hydraulique y est plus faible à cause d'une densité plus élevée (Craft, 2016). Plus récemment, Clymo et Bryant (2008) ont identifié un troisième horizon, appelée mésotelm, qui représente une zone de transition entre l'acrotelm et le catotelm, où la fluctuation de la nappe entraîne des oscillations d'oxydoréduction et un turn-over élevé du carbone.

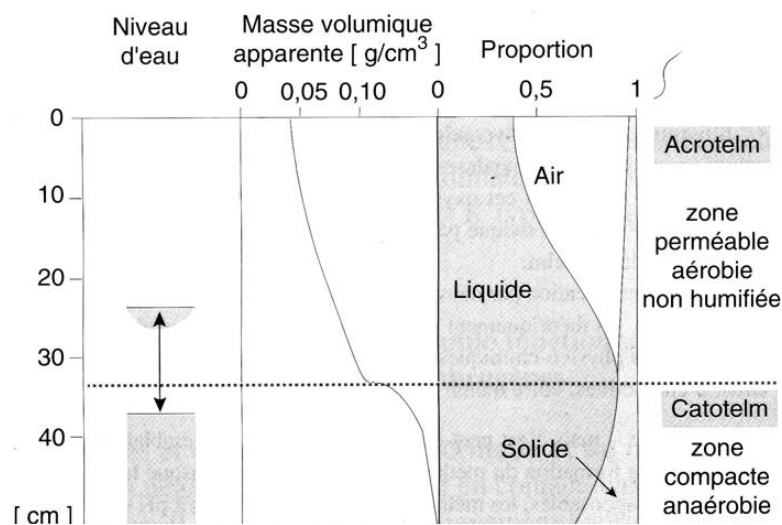


Figure II.3. Exemple de quelques caractéristiques typiques de l'acrotelm et du catotelm dans une tourbière ombrotrophe (d'après Gobat et al., 1998).

À une échelle locale, les tourbières sont généralement subdivisées en trois habitats : la butte, la platière et la gouille (ou dépression) (**Figure II.4**), définis, entre autres, par leur proximité à la nappe et par leurs assemblages végétaux caractéristiques (Moore et al., 2019). Les buttes (*hummock* en anglais) sont élevées de 20 à 50 cm au-dessus du niveau moyen de l'eau et sont formées par la croissance des sphaignes. Par sa structure, la butte est plus oxygénée, ce qui aide l'implantation de plantes vasculaires qui fournissent à leur

tour à la sphaigne un soutien structurel pour construire la butte (van Breemen, 1995). À l'inverse, les dépressions (*hollow* en anglais) sont plus proches de la nappe et peuvent parfois être inondées. Elles sont souvent composées de tourbe nue, c'est-à-dire non végétalisée, avec une fine couche d'algues qui les recouvre, la végétation périphérique y est plutôt composée de sphaignes (Rydin et al., 2006). La proximité de la nappe fournit davantage de nutriments, ce qui accentue les différences entre la butte et la gouille. La zone de transition entre la butte et la gouille (*lawn* en anglais), appelée platière, est également un habitat prédominant dans les tourbières. Les platières se trouvent généralement à 5-20 cm au-dessus de la nappe. Les graminoides (plantes de la famille des Cypéraceae, Poaceae et Juncaceae) y sont dominantes. Grâce à leur système racinaire solide, les platières sont souvent assez compactes. La couverture de sphaignes peut y être également très diverse et très riche (Rydin et al., 2006).

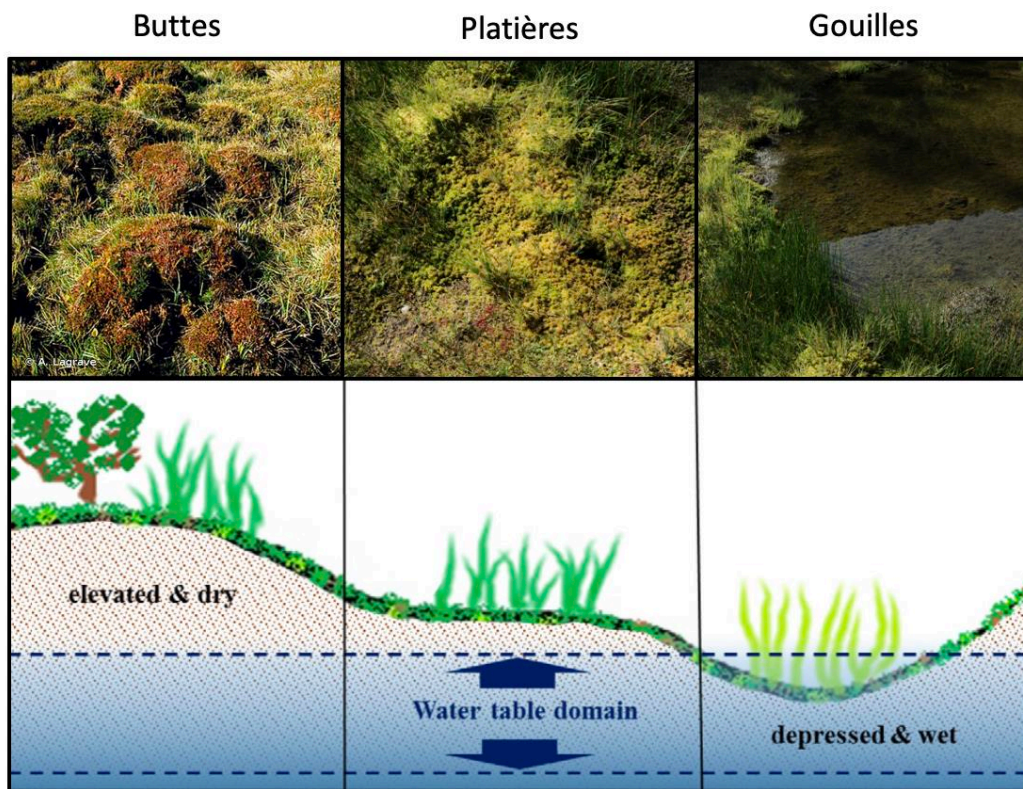


Figure II.4. Schéma représentatif des 3 microhabitats d'une tourbière : butte (hummock), platière (lawn) et dépression (hollow).

Schema réalisé à partir de Krohn et al., (2017)

II.1.3. La sphaigne : l'espèce ingénieuse des tourbières

Pour identifier et décrire une tourbière, la végétation est régulièrement utilisée. Il existe différents types de tourbières, pouvant être dominées par des laïches (dites à grandes ou à petites laïches), par des roseaux, ou encore par des sphaignes. Les sphaignes sont les espèces végétales emblématiques des tourbières (Rydin et al., 2006). Les sphaignes sont regroupées dans le genre *Sphagnum* qui appartient à l'embranchement des bryophytes (Figure II.5). Elles présentent des caractéristiques très spécifiques, aussi bien morphologiques que physiologiques leur permettant de survivre sous les conditions environnementales très particulières des tourbières (faibles concentrations en éléments essentiels et en nutriments). Cette adaptation réside dans le fait que les sphaignes ont la capacité de capter et de fixer les nutriments (principalement le calcium, le potassium, le sodium et le magnésium nécessaires à leur développement). Les sphaignes sont dépourvues de racines mais sont capables de transférer les métabolites de la partie inférieure de la tige à la partie apicale de la plante (appelé le capitulum), alors même qu'elles sont dépourvues de tissus conducteurs spécialisés, le transport se faisant par de petites perforations (appelées plasmodesmes) situées aux extrémités des cellules de la tige (Rydin et al., 2006).

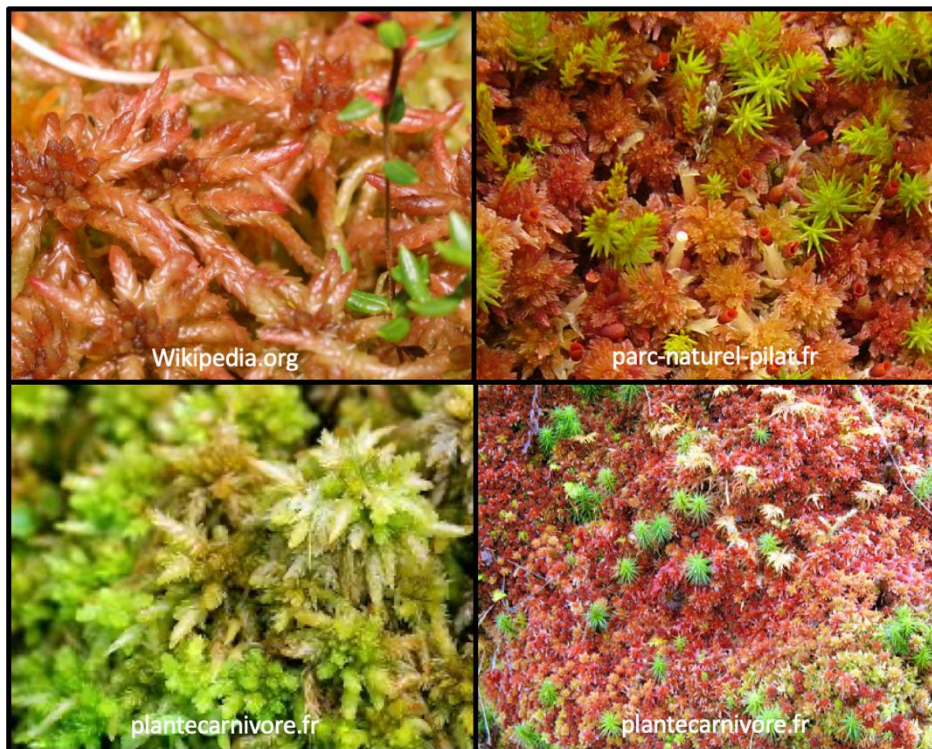


Figure II.5. Exemple de photographie de *Sphagnum* spp.

Pour se procurer ces éléments nutritifs, les sphaignes possèdent des molécules spécifiques situées dans les parois de leurs cellules qui jouent le rôle d'« échangeurs de cations » (Manneville et al., 1999). Ainsi, ces

II.1.4. Le rôle des tourbières dans le cycle du carbone

Le stock actuel de carbone des tourbières du nord est estimé environ entre 545 et 1055 Gt de carbone (Nichols and Peteet, 2019). Cependant, ces estimations ont longtemps été exclues des modèles climatiques globaux et dans la quantification du futur changement climatique (Limpens et al., 2008). Les tourbières qui ne représentent qu'environ 3 % de la surface terrestre (Leifeld and Menichetti, 2018), séquestrent pourtant environ 20 à 30% du stock total de carbone organique du sol. Les tourbières du nord, qui produisent environ 36 Tg $\text{CH}_4\text{-C yr}^{-1}$, contribuent également aux émissions mondiales de méthane (Abdalla et al., 2016). Cependant, alors qu'une partie importante des tourbières est encore à l'état naturel, leur exploitation a transformé de grandes zones en sources de gaz à effet de serre (GES) (Leifeld et al., 2019). En effet, environ 2 Gt de carbone sont libérées chaque année par les tourbières drainées dans le monde, en raison de l'oxydation microbienne de la tourbe ou des feux de tourbe. Cela représente environ 5 % de l'ensemble des gaz à effet de serre d'origines anthropiques (Günther et al., 2020). Récemment, les campagnes de ré-humidification des tourbières drainées ont donné des résultats prometteurs en matière de réduction des émissions de carbone. Cependant, cela rétablit les émissions de méthane (Günther et al., 2020), un GES possédant une efficacité radiative beaucoup plus élevée, environ 34 fois plus que le CO_2 (Myhre et al., 2013).

II.1.5. Les tourbières et le changement climatique

Le réchauffement climatique actuel est susceptible d'avoir un fort impact sur les tourbières. Par exemple, Fenner et al., (2007) ont proposé que l'augmentation de la température et des concentrations atmosphériques en CO_2 pourrait augmenter la colonisation des tourbières par les plantes vasculaires, entraînant une diminution de la couverture en sphaignes, tout en stimulant l'activité microbienne souterraine grâce à l'augmentation du carbone labile dans les exsudats des racines des plantes vasculaires et la diminution des concentrations en composés polyphénoliques inhibiteurs exsudés par les sphaignes (Bragazza et al., 2013; Fenner and Freeman, 2011). L'abondance accrue des plantes vasculaires et l'augmentation de l'activité microbienne devraient par la suite modifier la teneur en nutriments du sol et les conditions de pH pour renforcer davantage cet accroissement des plantes vasculaires. D'autres conséquences de ce changement sont l'augmentation des taux de décomposition de la matière organique, l'augmentation des dégagements de CO_2 et des changements dans la qualité du carbone organique dissous (COD). Les températures élevées prévues aux latitudes septentrionales devraient également augmenter les taux d'évapotranspiration, abaissant la nappe par rapport à la surface du sol (Rouse et al., 1997). Cette baisse de la nappe favoriserait encore davantage les plantes vasculaires et pourrait menacer les sphaignes qui dépendent de la capillarité pour leur approvisionnement en eau et en nutriments,

renforçant encore les bouleversements dans les processus biogéochimiques des tourbières (e.g. Fenner and Freeman, 2011; Jassey et al., 2013). Cependant, d'autres scénarios ont également été proposés. Par exemple, Moore, (2002) estime qu'une augmentation significative des précipitations annuelles aux hautes latitudes pourrait contrebalancerait la diminution de la nappe d'eau due à la hausse des températures. Aujourd'hui encore, il n'existe pas de scénario unique de l'effet du changement climatique sur les tourbières du fait de leur répartition dans différentes régions du globe, de la variabilité régionale et locale des températures et des précipitations et des différents types de tourbières rencontrés à l'échelle mondiale.

II.2. La décomposition de la matière organique dans les tourbières

Comme nous l'avons vu précédemment, les tourbières sont des zones où la matière organique s'accumule du fait de la faible décomposition de cette dernière par les microorganismes. Cette faible activité microbienne est essentiellement le fruit de plusieurs facteurs tels que la saturation en eau, les faibles températures et l'acidité du milieu (e.g. Rydin et al., 2006). Cette décomposition n'est, bien entendu, pas absente des tourbières et nous détaillerons dans le paragraphe suivant les principales étapes de cette décomposition et comment cette dernière est contrainte par le gradient d'oxygène au sein d'une tourbière. Dans un deuxième temps, nous exposerons comment, à leur tour, les sphaignes contribuent à moduler cette décomposition.

II.2.1. Le rôle du métabolisme microbien

Dans les tourbières, comme dans la plupart des écosystèmes terrestres, la première étape de la décomposition de la matière organique est la fragmentation des plantes (et dans une moindre mesure de la faune du sol). Avant d'être activement transportés à travers les parois cellulaires des microorganismes, les résidus végétaux sont hydrolysés via des enzymes extracellulaires en molécules de taille relativement petite (~ moins de 600 Da) (Hedges and Oades, 1997; Weiss et al., 1991). Ainsi, dans un sol vivant, il existe un grand nombre de composés organiques divers présents à différents stades de décomposition (Bosatta and Agren, 1991), qui passent de composés de grande taille, complexes et riches en énergie à des composés de plus petite taille, moins complexe et moins énergétique (Essington, 2004). La diminution de la taille des polysaccharides augmente la proportion de groupes polaires et ionisables, ce qui accroît la solubilité de ces polymères dans l'eau. Simultanément, la réactivité des composés vis-à-vis des surfaces minérales augmente au fur et à mesure de leur incorporation en agrégats, rendant leur décomposition plus difficile (Lehmann and Kleber, 2015) (**Figure II.7**).

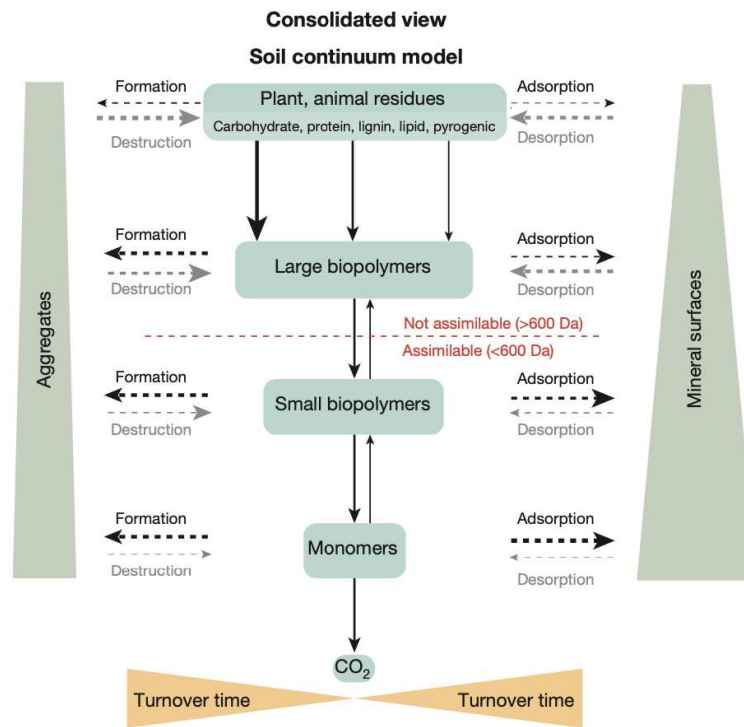


Figure II.7. Schéma conceptuel de la dégradation des débris végétaux en monomères.

Ce schéma a été proposé par Lehmann and Kleber (2015), reprenant les modèles classiques de transformation de la matière organique tels que l'humification, la dégradation progressive et la dégradation préférentielle. Dans cet article, ils décrivent une décomposition progressive et continue de de la matière organique.

Comme pour l'ensemble du vivant, les microorganismes ont besoin d'énergie pour leur croissance, la synthèse des macromolécules (ADN, ARN et protéines) et le transport actif des substrats dans la cellule (i.e. l'anabolisme). Cette production d'énergie implique la dégradation de composés organiques ou inorganiques (i.e. catabolisme). Les bactéries autotrophes utilisent l'énergie pour la réduction du CO₂ comme source unique de carbone, tandis que les bactéries hétérotrophes sont capables d'utiliser plusieurs types de composés organiques. Ainsi, la production d'énergie et la croissance sont couplées et il existe une corrélation linéaire entre la production d'énergie et le taux de reproduction chez les microorganismes (Fenchel, 2017).

Dans l'acrotelm, (majoritairement sous conditions aérobies), les microorganismes vont pouvoir utiliser l'oxygène comme accepteur d'électron terminal. Notons que la respiration de l'O₂ produit plus d'énergie que tout autre processus métabolique (**Figure II.8**). À l'inverse, dans le catotelm, où l'oxygène tombe à des

concentrations micromolaires (conditions anaérobies), d'autres accepteurs d'électrons terminaux vont être utilisés. Les polysaccharides vont donc être dégradés par une succession de fermentations en alcools de faible poids moléculaire, en dihydrogène (H_2) et en acides gras (dont l'acétate). Ensuite, ces produits de fermentation vont être utilisés comme substrats pour la respiration anaérobie avec une grande variété d'accepteurs terminaux d'électrons (ATE), pour produire du dioxyde de carbone en minéralisant le carbone organique. Par exemple, la fermentation complète des hydrates de carbone en acétate, CO_2 et H_2 , n'est thermodynamiquement possible que lorsque la tension ambiante d' H_2 est faible ($\sim 10^4$ atm). Cela dépend de l'activité des microorganismes qui consomment de l' H_2 , notamment les réducteurs de sulfate (sulfato-réducteurs) et les méthanogènes. Cette relation syntrophique entre producteurs et consommateurs d' H_2 est une caractéristique essentielle des conditions anaérobies comme celles rencontrées dans les tourbières (Rydin et al., 2006).

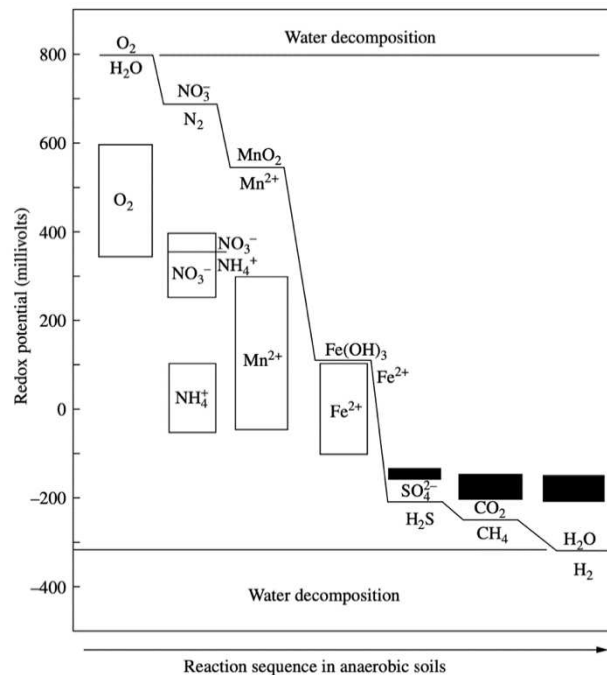
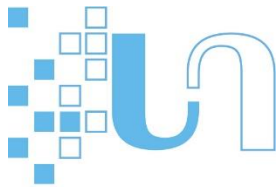


Figure II.8. Séquence thermodynamique pour la réduction des substances inorganiques par les microorganismes.

Les couples redox sont classés des donneurs les plus forts en haut à gauche aux accepteurs les plus forts en bas à droite. Plus la différence de potentiel de réduction entre le donneur d'électrons et l'accepteur d'électrons est grande, plus l'énergie libre est libérée.

Le type de respiration anaérobie dépendra de la disponibilité des accepteurs d'électrons externes et du rendement énergétique de l'oxydation des différents ATE. Après la respiration aérobie, le processus énergétique le plus favorable est la respiration du nitrate (NO_3^-) en ammonium

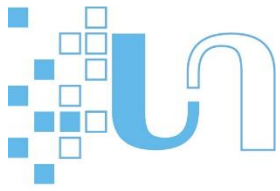


(NH_4^+) est souvent limitée par la disponibilité du NO_3^- . Lorsque le nitrate commence à s'épuiser, la réduction du manganèse (Mn_4^+), qui suit de près le nitrate dans la séquence de réduction, puis la réduction du Fe_3^+ en Fe_2^+ , ne peuvent se produire qu'en absence d'oxygène (les microorganismes réducteurs de Fe sont des anaérobies strictes). Lorsque ces ATE sont épuisés, la réduction du sulfate prévaut. Lorsqu'aucun autre accepteur d'électrons concurrent n'est disponible, le CH_4 est produit par des méthanogènes acétoclastiques et hydrogénotrophes par la scission de l'acétate et/ou la réduction du CO_2 par H_2 , respectivement (Mégonigal et al., 2004).

II.2.2. Le rôle des sphaignes

La décomposition lente et partielle de la sphaigne en tourbe peut aussi s'expliquer par la composition de la sphaigne. Les sphaignes sont composées de différents acides et de phénols qui les rendent résistantes à la décomposition. Étant dépourvues de lignine, ce sont les composés phénoliques acides comme l'acide hydroxybenzoïque ou d'autres dérivés bibenzyls qui vont participer à la rigidité des parois cellulaires. La p-hydroxyacétophénone et les acides p-hydroxybenzoïques forment un matériel difficilement biodégradable pour les microorganismes car résistant à la plupart des dégradations enzymatiques, comme les activités hydrolase ou β -glucosidase (Rasmussen et al., 1995; Tutschek, 1979; Wilschke et al., 1989). De plus, les acides uroniques, qui représentent de 10 à 30 % de la masse sèche de la sphaigne, sont capables de se lier à l'azote, rendant ainsi ce nutriment indisponible pour l'activité microbienne (Børshøj et al., 2001).

D'autres composés phénoliques tels que l'hydroxybuténolide, l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide p-coumarique et l'acide t-cinnamique ont un fort caractère hydrophile (Rasmussen et al., 1995) facilitant leur libération par la sphaigne (Jassey, 2013). Ils sont excrétés dans l'environnement, où ils peuvent avoir des effets inhibiteurs sur les différents microorganismes impliqués dans le processus de décomposition (Verhoeven and Liefveld, 1997). En effet, les extraits de sphaigne peuvent avoir des propriétés toxiques pour les bactéries en inhibant leurs activités (Banerjee and Sen, 1979; Mellegård et al., 2009). Par exemple, l'effet inhibiteur de la sphaigne a été démontré dans une expérience en conditions contrôlées, comparant la dégradation de deux litières, une composée de sphaigne et l'autre de *Carex* (Verhoeven and Toth, 1995). Comme attendu, la litière dominée par la sphaigne s'est décomposée plus lentement que celle dominée par le *Carex*. De plus, suite à l'ajout d'un extrait de *Sphagnum capitulum*, les auteurs ont observé que la décomposition des deux types de litière était considérablement ralentie, alors que l'ajout d'un extrait de feuilles de *Carex* n'avait aucun effet sur la dégradation. Cette étude a donc conduit les auteurs à conclure que les composés phénoliques hydrosolubles avaient un fort effet inhibiteur sur la décomposition de la litière.

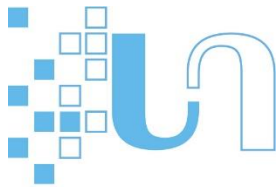


Cependant, malgré une faible abondance de matière organique facilement dégradable, une forte concentration de composés inhibiteurs et des conditions majoritairement anoxique, les études menées sur les tourbières ont révélé une forte diversité microbienne.

II.3. La diversité microbienne des tourbières

Les microorganismes sont les formes de vie les plus abondantes, les plus diverses et les plus omniprésentes sur Terre. Avec une biomasse microbienne estimée de 1 tonne à 10 tonnes par hectare, les communautés microbiennes du sol représentent une fraction importante de la biomasse vivante terrestre (Fierer, 2017). L'énorme diversité taxonomique, phylogénétique et fonctionnelle des microorganismes du sol a été abondamment étudiée depuis plusieurs décennies du fait de son implication dans les fonctions écosystémiques assurées par le sol à travers les cycles biogéochimiques d'éléments majeurs tels que le carbone, le phosphore, le soufre et l'azote, mais également pour l'intérêt opérationnel que l'étude de cette diversité représente pour la gestion des sols (e.g. agriculture, dépollution) (Brookes, 1995; Wall et al., 2019). Ces études ont également permis d'imposer l'écologie microbienne des sols comme une discipline à part entière, ayant pour objectif de mieux connaître la biodiversité des sols mais également d'évaluer les relations entre biodiversité, fonctions et services écosystémiques, ainsi que de déterminer l'impact des conditions environnementales sur la diversité et le fonctionnement biologique des sols (e.g. Torsvik and Øvreås, 2002). Aujourd'hui encore, l'écologie microbienne des sols constitue un champ de recherche très important.

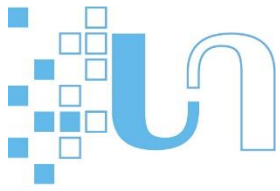
Les tourbières se distinguent des autres types d'écosystèmes terrestres par la présence d'un sol « organique » avec une densité élevée en carbone (C) et en azote (N) et une teneur en matière organique souvent supérieure à 90 % (Frolking et al., 2001; Tarnocai et al., 2009). À titre de comparaison, et bien que l'étude de la diversité des microorganismes dans les tourbières soit l'objet d'un intérêt croissant, la description de cette diversité, les processus maintenant cette diversité et son rôle dans le fonctionnement et la stabilité des tourbières reste à ce jour très peu explorés. Dans cette troisième partie, nous allons d'abord donner un aperçu du rôle des microorganismes dans le fonctionnement des tourbières, puis nous allons décrire la diversité microbienne des tourbières à travers une étude bibliographique, et enfin nous discuterons de l'influence des paramètres physico-chimique sur la structure des communautés microbiennes.



II.3.1. Les activités des microorganismes dans le fonctionnement des tourbières

Historiquement, les communautés microbiennes des tourbières ont été étudiées par des approches fonctionnelles. Si les tourbières sont d'importants stocks de carbone, le réchauffement climatique fait craindre que ce carbone soit minéralisé par les microorganismes (voir section I.5). La faible décomposition de la matière organique dans les tourbières et la perspective du changement climatique a conduit Freeman et ses collaborateurs à établir la théorie du verrou enzymatique (Freeman et al., 2001). Cette théorie repose sur le constat que les conditions anaérobies des tourbières empêchent les phénols oxydases d'éliminer les composés phénoliques qui inhibent la biodégradation de la matière organique. En conséquence, cela empêcherait le relargage de l'important stock de carbone des tourbières dans l'atmosphère. Or, le réchauffement climatique pourrait induire une augmentation de l'évapotranspiration, diminuer le niveau de la nappe en permettant l'oxygénation des couches de surface et ainsi réactiver les enzymes hydrolytiques responsables de la décomposition de la tourbe (Freeman et al., 2001). Freeman et ses collaborateurs ont ainsi montré que la déshumidification de tourbe entraînait la stimulation de la croissance bactérienne et une augmentation de l'activité phénol oxydase associée à une diminution des composés phénoliques dans la tourbe. Ceci provoquant une nouvelle stimulation de la croissance microbienne et l'augmentation de la dégradation de la matière organique, entraînant par un effet cascade la libération du dioxyde de carbone (Fenner and Freeman, 2011). Depuis, il a été établi que l'augmentation du pH induisait une augmentation de l'activité phénol oxydase, entraînant la libération de composés phénoliques et de carbone organique dissous (COD) (Kang et al., 2018).

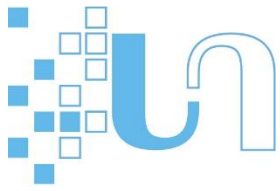
D'autres études ont été menées dans les tourbières afin de comprendre le rôle des microorganismes dans le relargage de CO_2 et de CH_4 , les deux principaux gaz à effet de serre. Des approches fonctionnelles ont été menées en conditions expérimentales, au cours desquelles des activités enzymatiques, la respiration hétérotrophe et la biomasse ont été étudiées en faisant varier des paramètres environnementaux. Ainsi, Preston et al., (2012) ont montré que le pH et la qualité du substrat tourbeux influençait les activités enzymatiques aussi bien dans les tourbières ombrotrophes que minérotrophes du Canada. Il a également montré que l'augmentation de la température de la tourbe et l'aération stimulaient la production de CO_2 , mais que cela n'était pas corrélé à une augmentation ou une diminution des activités enzymatiques. Dans une étude menée sur les tourbières tropicales du Panama, Sjögersten et al., (2011) a identifié que la biomasse microbienne était corrélée à la concentration des nutriments. Les rapports C:P et N:P microbiens et les activités enzymatiques augmentaient dans les tourbières pauvres en nutriments démontrant que les nutriments limitaient l'activité des microorganismes. En revanche, ils n'ont pas observé de variations nettes des flux de CO_2 et de CH_4 le long du gradient de nutriments, malgré que la respiration potentielle du sol dans les sols drainés soit plus faible dans les sites pauvres en nutriments. Ensemble, ces études ont montré que les microorganismes étaient influencés par les conditions environnementales, mais n'ont pas



permis de faire de lien direct entre production de gaz à effet de serre et activité microbienne. De plus, plusieurs questions demeurent, et notamment : quelles espèces microbiennes trouve-t-on dans les tourbières ? Quel est le rôle de la diversité dans le fonctionnement de ces écosystèmes ? La dégradation de la matière organique et le relargage de CO₂ est-elle réalisée par des microorganismes spécifiques ou est-ce l'œuvre de l'ensemble de la communauté ?

II.3.2. État des lieux non-exhaustif de la diversité taxonomique des microorganismes dans les tourbières

Les études décrivant les communautés microbiennes des tourbières se sont intensifiées ces dernières années avec l'avènement du séquençage haut-débit. Le **Table II-1** dresse un bilan non-exhaustif des recherches qui ont été menés sur les microorganismes des tourbières au cours des dix dernières années par séquençage des régions des gènes de la petite sous-unité de l'ARN ribosomique (16S ou 18S rRNA). Globalement, ce sont surtout les tourbières de l'hémisphère nord qui ont été étudiées, avec un nombre conséquent d'études sur les tourbières du plateau tibétain (Chine). Des recherches ont également été menées sur les tourbières du nord de l'Europe, des États-Unis et du Canada alors que les études concernant les tourbières tropicales sont peu nombreuses. D'après la littérature, il semblerait que différents profils émergent selon les tourbières étudiées. Parmi les tourbières du nord, qui, pour la plupart d'entre elles, ont la particularité d'être en permanence gelée (Tarnocai et al., 2009), notre synthèse non-exhaustive révèle une forte abondance de Proteobacteria et d'Actinobacteria (Hu et al., 2015; Yun et al., 2014). Par exemple, Müller et al., 2018 montre qu'environ 70% des séquences collectées appartiennent à la famille des Intrasporangiaceae (Actinobacteria) dans les couches du permafrost encore gelées. Cette forte abondance de Proteobacteria et d'Actinobacteria est une signature typique des permafrosts analysés au Canada, en Alaska ou encore en Antarctique (Jansson and Taş, 2014), mais pas nécessairement celle des permafrosts en cours de dégel (Mondav et al., 2017; Müller et al., 2018), alors plutôt dominés par des Acidobacteria et des Proteobacteria. Il est à noter cependant que dans leurs travaux, Mondav et al. (2017) ont mis en évidence une très forte abondance d'Euryarchaeota dans les tourbières avec une abondance relative pouvant atteindre 50% dans les couches profondes de tourbe, alors qu'elles n'excèdent pas plus de quelques pourcents dans de nombreuses autres études (voir **Table II-1**). Dans les tourbières tropicales, les Proteobacteria, les Acidobacteria, les Chloroflexi, les Verrucomicrobia, et les Planctomycetes sont fréquemment retrouvées (Finn et al., 2020; Too et al., 2018). Une forte abondance de Proteobacteria, Acidobacteria et Verrucomicrobia a été également décrite dans une tourbière de montagne de République Tchèque (Chroňáková et al., 2019) mais aussi dans une tourbière de forêt dans le Minnesota, USA (Lin et al., 2014). Une fréquente dominance des Proteobacteria et des Acidobacteria a été observée dans des tourbières de Chine, suivies par des Chloroflexi (Wang et al., 2019; Zhong et al., 2017) ou des Actinobacteria



(Tian et al., 2019) et des Firmicutes (Zhou et al., 2017) et parfois des Bacteroidetes (Deng et al., 2014). Enfin, une étude portant sur vingt tourbières le long d'un transect entre l'Amérique du Nord et le Canada (de 69 à 1258 m d'altitude) a montré que les Proteobacteria, les Acidobacteria et les Actinobacteria étaient des phyla les plus communément rencontrés dans ces tourbières (Seward et al., 2020). Ainsi, même si un petit nombre de phylum dominant sont fréquemment retrouvés (i.e. Acidobacteria, Proteobacteria, Actinobacteria), une grande variabilité de composition en microorganisme est observée d'une tourbière à l'autre. Dans la section précédente, nous avons vu que les paramètres physico-chimiques avaient une influence sur l'activité microbienne, nous allons maintenant discuter de comment cet environnement structure cette diversité microbienne.

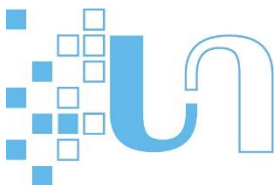
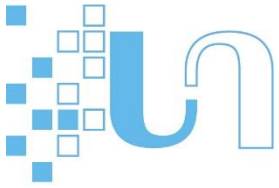


Table II-1. Aperçu des recherches menées sur les microorganismes des tourbières au cours des dix dernières années via un séquençage haut débit (16S rRNA).

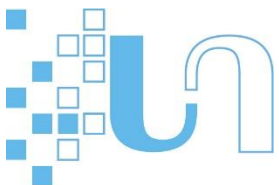
Dans la colonne « plan d'échantillonnage », la distinction a été faite entre un échantillonnage effectué sur une tourbière unique (site) ou à travers des tourbières différentes (tourbières).

Localisation	Plan d'échantillonnage		Résultats principaux	Références
Tourbière du permafrost du plateau tibétain, Chine	3 sites x 2 tourbières	0-5 cm au-dessus de la WT (5-10 and 10-15)	pH : 9.28 et 5.41. Proteobacteria, Actinobacteria et Chloroflexi groupes les plus abondants. Acidobacteria uniquement abondant dans la zone humide acide. Ces 4 groupes représentent 80% de la diversité totale	Yun et al., 2014
Permafrost du plateau tibétain, Chine	1 site x 1 carotte	16 échantillons sur un carotte de 10m de long	pH : ~8.6, C/N : 12. Dominée par Proteobacteria, Actinobacteria, mais Firmicutes, Acidobacteria, et Bacteroidetes aussi abondantes. pH, conductivité et teneur en carbone organique principaux paramètres influençant les communautés bactériennes	Hu et al., 2015
Permafrost en cours de dégel (Stordalen Mire) au Nord de la Suède	1 site x 3 habitats x 2 carottes	Palsa : 12 échantillons Bog: 10 échantillons (WT: +5 à -30cm) Fen: 15 échantillons (WT: 0 à -5 cm)	fen (pH : 5.7) diversité alpha, beta et phylogénétique la plus élevée, dominée par les Proteobacteria et Euryarchaeota (enrichie en méthanogènes) ; Palsa avec permafrost intact (pH : 4.2) dominé par les Acidobacteria et les Proteobacteria ; bog avec permafrost en dégel (pH : 4.2) dominé par les méthanogènes hydrogénotrophes et les Acidobacteria (diversité alpha inférieure)	Mondav et al., 2017
Forêt marécageuse tropicale à tourbe, Malaisie	1 site x 1 carotte	Surface, 45 et 90 cm	pH : de 3.49 à 3.17, C/N : de 28.65 à 49.99. La diversité microbienne plus élevée en surface. Proteobacteria phylum dominant, suivies par les Acidobacteria, Verrucomicrobia, Planctomycetes. Faibleabondance des Euryarchaeota	Too et al., 2018



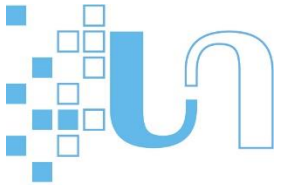
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Tourbière dans la forêt expérimentale de Marcell, Minnesota, USA	2 sites x 2 saisons	Bog : 7 échantillons en hiver, 8 échantillons en été Fen : 7 échantillons en hiver, 8 échantillons en été (WT: 20-30)	Bog (pH 3.5 à 4.0) et fen (pH 4.5 à 4.8) C/N : de 2.01 à 0.86. Surface : Acidobacteria, Proteobacteria et Verrucomicrobia. En profondeur (75 à 175 cm) : Les Archaea (Crenarchaeota groupes 1.1c et 1.3) atteignant jusqu'à 60% dans le fen. "hot spot" détecté dans le mésotelm, composé d'Acidobacteria et de Syntrophobacteraceae, corrélé avec la teneur en carbohydrates et en acides organiques. Faible abondance des Euryarchaeota	Lin et al., 2014
Tourbière de Zoige au Nord-Est du plateau tibétain, Chine	3 sites x 1 carotte	0-10, 20-30, 50-60, 90-100 cm H site (WT = 0.32 cm) M site (WT = -4.04 cm) L site (WT = -10.37 cm)	pH : de 5.94 à 5.23. Proteobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi groupes les plus abondants. La baisse de la nappe réduit l'alpha diversité dans les couches intermédiaires (20-30 cm et 50-60 cm). Diminution de la nappe induit l'augmentation des oligotrophes (e.g. Acidobacteria) par rapport aux copiotrophes (e.g. Bacteroidetes). pH, carbone organique total et l'azote total structurent les communautés microbiennes. Faible abondance des Euryarchaeota	Zhong et al., 2017
Deux tourbières au Nord-Est (Hani) et au Sud-Ouest (Riganqiao) de la Chine	2 tourbières* x 1 carotte *en triplicat	10-20, 30-40 and 60-70 cm (WT : 35.7 et 3.7)	pH : 5.7 et 6.0. Gamma, Delta et Alphaproteobacteria (50%) sont les plus abondantes, suivies par les Acidobacteria et les Chloroflexi. "hot spot" d'alpha diversité observé au niveau du mésotelm. pH et la profondeur de la nappe sont parmi les facteurs abiotiques qui structurent le plus la composition de la communauté microbienne	Wang et al., 2019
Tourbière de Dajiuhu, en Chine centrale	4 sites x 3 micro-habitats x 3 carottes	0-5 cm (WT: 0, -5, -8, -5)	pH : 5.7, 6.8, 5.8, 5.4, C/N: 30, 12, 22, 28. Les Alphaproteobacteria étaient la classe dominante dans tous les échantillons. Acidobacteria et Gammaproteobacteria sont abondantes dans les échantillons de tourbe de <i>Sphagnum palustre</i> et de <i>S. palustre</i> brune, respectivement. Cyanobacteria dominantes dans les échantillons <i>S. palustre</i> verte. La différenciation des micro-habitats contribue principalement aux différences structurelles du microbiome bactérien	Tian et al., 2019
Tourbières du plateau tibétain, Chine	3 tourbières x 1 carotte	0-5 cm (WT: gouille +15 et butte -5)	Butte et gouille de 3 tourbières. pH: 6.14 à 4.38, 6.23 à 5.73, 8.36 à 7.92. Proteobacteria (34.5%), Actinobacteria (17.3%) et Bacteroidetes (11%) sont les groupes les plus abondants dans tous les sites. Alpha et Gammaproteobacteria sont structurées en fonction du site. pH est l'une des principales propriétés du sol qui influencent la composition et la diversité de la communauté microbienne. Faible abondance des Euryarchaeota	Deng et al., 2014



SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Montagne de Sumava (1100m), Sud-Ouest de la République Tchèque	3 sites x 3 microhabitats x 4 carottes	0–30 cm (WT: -5.6, -10.7, -17.6)	pH : de 4.31 à 3.94. Proteobacteria, Acidobacteria, Verrucomicrobia sont les groupes les plus abondants. Les Alphaproteobacteria sont significativement plus abondantes dans les aires à linaigrettes et celle à myrtilles que dans celle à sphaignes. Le pH et la teneur totale en N gouvernent les communautés microbiennes. Les alternances saisonnières de la composition des communautés microbiennes étaient peu explicatives	Chronakova et al., 2019
Permafrost en cours de dégel dans l'Extrême-Arctique au Svalbard, Norvège	1 sites x 2 carottes	6-20, 20-36, 57-74, 57-73, 74-89, 73-83, 89-107, 95-107, 167-187, 167 - 185 cm	pH: 4.6. Surface (0-75): Alphaproteobacteria, Chloroflexi, Acidobacteria, Verrucomicrobia. Zone de transition (75-85): Bacteroidetes (Bacteroidia). Permafrost (85-198): Actinobacteria (Intrasporangiaceae), ces deux taxons ont causé une différence de communauté d'environ 60% sur juste 3 cm de profondeur. taux de production de CO ₂ les plus élevés dans les couches de surface	Müller et al., 2018
Vingt tourbières en Amérique du Nord et au Canada (de 69 à 1258 m d'altitude)	20 tourbières x 1 carotte	10–20, 30–40, 60– 70 cm	pH : de 3.98 à 7.75. Proteobacteria, les Acidobacteria et les Actinobacteria dominantes. Les fens intermédiaires et riches abritaient une plus grande diversité et richesse taxonomique. Le pH est le plus fort prédicteur de la structure des communautés microbiennes. Faible abondance des Euryarchaeota	Seward et al., 2020
Tourbières tropicales du bassin Pastaza-Marañón, Amazonie péruvienne	7 tourbières x 1 carotte	0–15 et 15–30 cm	pH: de 5.9 (Minerotrophique) à 2.5 (Ombrotrophique). Cette variation de pH induit une forte structuration des Proteobacteria en Acidobacteria. Les Chloroflexi sont également présentes à un pH de 5.9 à 5.6. Une plus grande diversité AlphaProteo a été observée pour les sites possédant le pH le plus élevé. La production de CH ₄ est nettement plus élevée à pH 5.9, le flux de NO ₂ plus élevé à pH 5.9 et 2.5, et les émissions de CO ₂ sont plus faibles à pH 3.7. Faible abondance des Euryarchaeota. La concentration en nutriments façonne les communautés microbiennes, ainsi que les méthanogènes (Methanobacteriaceae) et les méthanotrophes (Methylocystaceae). La méthanogénèse hydrogénotrophe est la principale source de CH ₄	Finn et al., 2020
Chronosequence des tourbières dans la plaine de Sanjiang, Chine	3 tourbières x 3 carottes	0–30, 30–60, 60–100, 100–200cm	Minerotrophic fens. pH: de 4.80 à 5.91, C/N: de 2.50 à 34.16. Proteobacteria (50%), Actinobacteria, Acidobacteria, Firmicutes sont les groupes les plus abondants. Les indices de diversité varient en fonction de la profondeur et des propriétés physico-chimiques : carbone total, azote total, pH et densité apparente. La beta diversité est significativement corrélée avec l'âge du sol	Zhou et al., 2017



SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Obukhovskoye (Russia), and Saxnäs Mosse (Sweden) Peatlands	2 tourbières x 1 carotte	5-10 cm, 10-20 cm, 20-30 cm, 30-40 cm, 40-50 cm (WT: from 15 to 30, and from 14 to 25)	Deux tourbières ombrotrophes acides dominées par la sphaigne. pH : 4.1, 4.0. À Obukhovskoye, les Actinobacteria et les Alphaproteobacteria (Rhizobiales) sont les principaux groupes bactériens à 5-20 cm, suivis par les Acidobacteria à 20-30 cm (48%) et 40-50 cm (38%), et les Planctomycetes (54%) à 30-40 cm. A axnäs Mosse, les Acidobacteria étaient partout dominantes (46%), suivies par les Deltaproteobacteria (Syntrophobacterales), Verrucomicrobia et à 40-50cm Thaumarchaeota (38%)	Moore et al., 2015
Peatland in Obukhovskoye, Russia	1 site x 1 core	10–15 cm (oxic–anoxic interface)	Tourbières ombrotrophes acides dominées par la sphaigne. pH 4.0. Communauté bactérienne dominée par les Alphaproteobacteria et les Acidobacteria. L'ajout de cellulose a induit un changement net de la communauté et a augmenté l'abondance des Bacteroidetes. Subdivision 1 Les Acidobacteria étaient capables de dégrader la cellulose à un rythme très lent.	Pankratov et al., 2011

II.3.3. Rôle de l'environnement abiotique sur la structure des communautés microbiennes des tourbières : quels sont les principaux facteurs ?

Comme nous avons pu le voir dans la section précédente, les tourbières possèdent une importante diversité microbienne, qui semble aussi bien varier en fonction de la longitude, de la latitude que de l'altitude. Ceci est en partie expliqué par les variations des différents paramètres environnementaux qui régissent ces écosystèmes tourbeux. Le système de classification suédois des tourbières développé par Du Rietz et élaboré par Sjörs (1948), se base sur la végétation et le pH (le gradient « bog-poor fen-rich fen ») et sur le gradient d'humidité-aération (« hummock-mud-bottom »). En effet, ces deux gradients structurent fortement les communautés, aussi bien la végétation que les microorganismes. Un large gradient de pH est observé dans les tourbières à travers le monde. Ainsi, la synthèse non-exhaustive des études réalisées dans ces écosystèmes (**Table II-1**), indique qu'il est possible d'avoir environ 7 unités de pH d'amplitude entre les valeurs extrêmes, les pH les plus forts ont été mesurés en Chine, au niveau du plateau tibétain, avec des valeurs pouvant atteindre 9.28 (Yun et al., 2014) et les plus faibles (pH de 2.5) dans la tourbière de San Jorge, une tourbière marécageuse tropicale au nord-est du Pérou (Finn et al., 2020). Ce paramètre influence fortement la composition des microorganismes, avec des Acidobacteria toujours majoritaire à pH faible, et Proteobacteria à des pH plus élevé (voir par exemple Pankratov et al., 2011; Seward et al., 2020). Ce paramètre est d'ailleurs régulièrement décrit comme l'un des paramètres les plus structurant (voir par exemple Chroňáková et al., 2019; Seward et al., 2020). La profondeur de la nappe est également un paramètre déterminant de la diversité microbienne. Par exemple, la profondeur de la nappe influence la diversité alpha (la diversité locale) et la distribution d'Archaea (Zhong et al., 2017). Dans les tourbières de Russie, il a été montré que la profondeur a une forte influence sur la distribution des microorganismes, avec une forte abondance d'Alphaproteobacteria et d'Actinobacteria entre 5 et 20 cm, d'Acidobacteria à 20-30 cm, puis de Planctomycetes à 30-40 cm et de Thaumarchaeota à 40-50cm (Moore et al., 2015). Zhou et al., 2017 ont déterminés que le carbone total, l'azote total, et la densité apparente influençait la diversité alpha et la composition des microorganismes (diversité beta). Enfin, des analyses réalisées dans sept tourbières tropicales du bassin Pastaza-Marañón en Amazonie péruvienne indiquent que la teneur en nutriments impacterait la structure de communautés microbiennes (Finn et al., 2020).

II.4. Le cas des tourbières pyrénéennes

Si les tourbières situées dans l'hémisphère nord sont aujourd'hui bien documentées dans la littérature (Emerson et al., 2018; McCalley et al., 2014; Mondav et al., 2017, 2014; Singleton et al., 2018; Woodcroft et al., 2018), les tourbières méridionales de l'hémisphère nord sont encore mal étudiées. Parmi ces dernières et dans le cadre de cette thèse, nous allons nous focaliser sur le cas particulier des tourbières

pyrénéennes. Ces tourbières sont généralement petites, situées à des altitudes plus élevées et ont la particularité d'être soumise à des conditions climatiques très contrastées (i.e. climat montagnard) (**Figure II.9**). Elles constituent un patrimoine naturel unique qui est, de nos jours, menacé par le changement climatique et d'autres activités humaines (développement, tourisme, etc.). Par exemple, entre 1949 et 2010, les températures moyennes sur la chaîne des Pyrénées ont augmenté de 1,2° Celsius alors que les précipitations moyennes ont diminué de 2,5% (source : <https://opcc-ctp.org/fr>). De plus, et alors qu'en théorie les tourbières d'altitude devraient être mieux préservées de la pression anthropique car plus difficiles d'accès et donc (partiellement) isolées des activités agricoles et industrielles, plusieurs travaux y ont mis en évidence la présence de mercure, d'éléments traces potentiellement nocifs ainsi que des microplastiques (Allen et al., 2019; Enrico et al., 2016; Hansson et al., 2017).

Dans les montagnes pyrénéennes, les tourbières sont principalement oligotrophes du fait que leur bassin-versant soit composé de roches granitiques et sédimentaires (principalement du calcaire et de l'ardoise), avec un développement du sol quasi inexistant. Elles évoluent sous des conditions climatiques contrastées avec des hivers froids et de longues périodes de couverture neigeuse et des étés chauds. De plus, selon l'orientation de la vallée, les tourbières peuvent être soumises à un régime climatique plutôt océanique, soutenue par un climat humide et un taux de précipitation élevé ou méditerranéen, avec un climat plus sec.

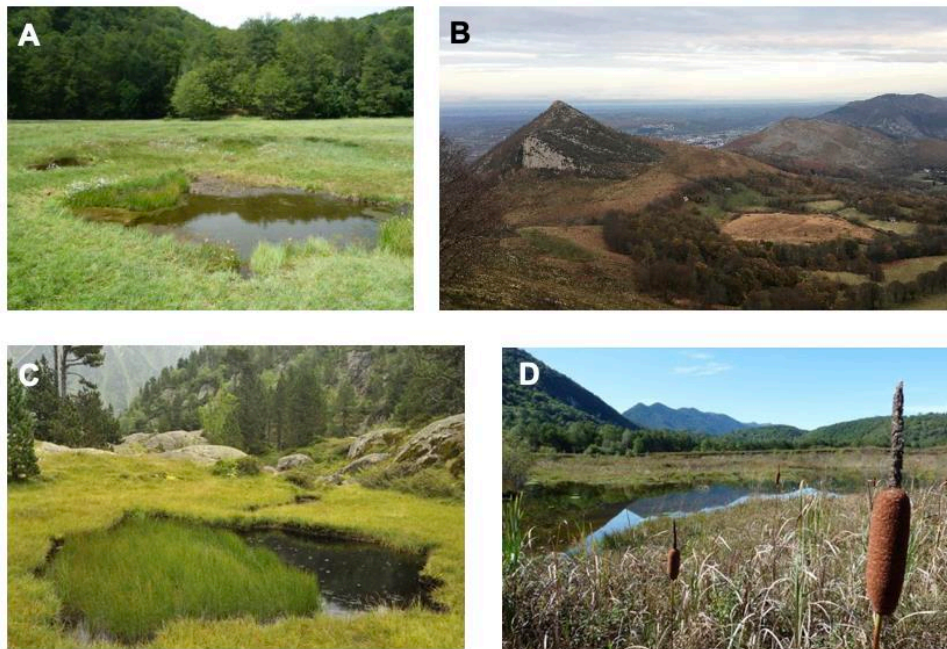
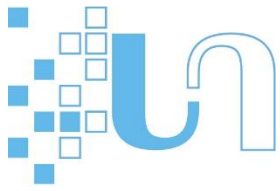


Figure II.9. Exemple de quatre tourbières pyrénéennes.

(A) *Tourbière de Bernadouze (Ariège)*, (B) *Tourbière d'Ech (Hautes-Pyrénées)* (C) *Tourbière de la Claou du Larribet (Hautes-Pyrénées)* et (D) *Tourbière de Pédéstartès (Pyrénées-Atlantiques)*. Photos, F. Rigal, B. Lauga, L. Nédélec et C. Plisson. Les tourbières de Bernadouze et d'Ech sont des tourbières instrumentées et font l'objet de suivi par le programme REPLIM et l'OHM Haut Vicdessos Haute vallée des Gaves.

Certaines tourbières pyrénéennes ont fait l'objet de nombreux travaux, qui se sont focalisés sur la caractérisation biogéochimique de leur environnement ainsi que sur les flux de carbone, méthane et de certains éléments traces dans l'espace et dans le temps (e.g. Le Roux et al., 2020; Monna et al., 2004; Rosset et al., 2020) (Figure II.9). À notre connaissance, aucune étude n'a jamais caractérisé les communautés microbiennes procaryotes de ces écosystèmes particuliers. En outre, et de manière plus générale, il existe peu de travaux portant sur la diversité microbienne des tourbières d'altitude (e.g. Praeg et al., 2019; Xu et al., 2014). Parce que le fonctionnement de ces zones humides est intimement lié aux microorganismes qui les habitent, il apparaît donc primordial de s'intéresser à l'incidence qu'exercent les communautés de microorganismes sur la dynamique de la matière organique dans les tourbières. Cependant, une meilleure compréhension de ces phénomènes réside principalement dans notre capacité à mieux caractériser les communautés de micro-organismes à la fois au niveau taxonomique et fonctionnel et d'identifier les variables physico-chimiques et environnementales responsables de la variabilité spatio-temporelle de la composition de ces communautés.

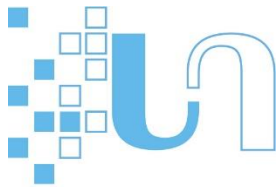


II.5. Objectifs de la thèse

Cette thèse a donc pour objectif d'améliorer la connaissance sur les microorganismes dans les tourbières, les paramètres environnementaux qui structurent les communautés microbiennes et d'étudier les capacités métaboliques des bactéries et des archées qui peuplent ces écosystèmes. Pour ce faire, nous avons échantillonné quatre tourbières localisées dans les montagnes du massif pyrénéen, mesuré de nombreux paramètres environnementaux, et caractérisé les communautés microbiennes par approche métagénomique ciblée (métabarcoding) et métagénomique non-ciblée. Ces travaux décrivent pour la première fois les communautés microbiennes des tourbières de montagne pyrénéenne. De plus, ces études se distinguent par un effort d'échantillonnage conséquent, regroupant 248 échantillons et permettant d'analyser la distribution des microorganismes dans des tourbières localisés en France, en Espagne et en Andorre. Ces études permettent de décrire les communautés microbiennes le long de différents gradients : latitudinal, spatial, profondeur et saisonnier. Pour chaque étude, les paramètres environnementaux les plus structurants ont été mesurés, permettant d'identifier les facteurs contribuant le plus à la structuration des communautés microbiennes.

Ainsi, les questions scientifiques qui ont guidé ces travaux ont été :

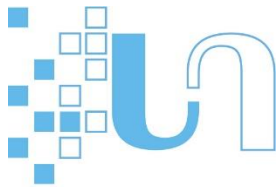
- Quels sont les microorganismes en présence dans les tourbières pyrénéennes ?
- Comment se distribuent les microorganismes et comment se structurent les communautés microbiennes le long du gradient de profondeur ?
- Quels sont les principaux facteurs qui structurent les communautés microbiennes dans l'espace ?
- Peut-on observer une dynamique saisonnière chez les communautés microbiennes des tourbières ?
- Est-ce que les buttes, platières et gouilles se distinguent-elles par des communautés microbiennes spécifiques ?
- Quelles sont les capacités métaboliques des bactéries et des archées qui peuplent ces écosystèmes ?
- Est-ce que les capacités métaboliques des microorganismes peuvent refléter les gradients environnementaux ?



II.6. Structure du document

La présente thèse est organisée en six parties dont trois (n°4, 5, 6) rédigées sous forme d'article en anglais. De brèves introductions rédigées en français sont intégrées en tête de chacun de ces trois parties afin de présenter le contexte des études. Ainsi, la thèse est composée de la façon suivante :

- La **partie 3** qui introduit les sites d'études et qui présente les méthodes qui ont été employées pour collecter et analyser les échantillons. Ce chapitre va aussi présenter les outils qui ont été utilisés pour mesurer les paramètres physico-chimiques.
- La **partie 4** décrit et compare les communautés microbiennes le long du gradient de profondeur dans trois tourbières de haute altitude localisées dans les Pyrénées (article sous presse).
- La **partie 5** étudie la distribution des microorganismes d'une tourbière à une fine échelle spatiale. Il analyse également l'influence de la saison et du micro-habitat sur la structure des communautés microbiennes (article en préparation).
- La **partie 6** examine les capacités métaboliques des bactéries et des archées qui peuplent les tourbières en utilisant une approche métagénomique (article en préparation).
- Finalement la **partie 7** synthétise l'ensemble des résultats pour les resituer dans un contexte plus général. Ce chapitre propose et développe des axes de recherches qui n'ont pas pu être traités dans les chapitres précédents.



Partie III. Matériels et méthodes

Ce chapitre est consacré à la description des sites d'étude et aux protocoles expérimentaux mis en œuvre pour collecter les échantillons dans quatre tourbières pyrénéennes. Les méthodes utilisées pour analyser les échantillons seront passées ici en revue, ainsi que le traitement des données. Les méthodes employées pour caractériser les paramètres physico-chimiques de chaque tourbière seront également détaillées dans cette partie.

III.1. Description de l'échantillonnage des tourbières de l'étage alpin localisées en Espagne et en Andorre

III.1.1. Localisation géographique des tourbières

Les Pyrénées sont une chaîne montagneuse, localisée au sud-ouest de l'Europe. Le massif est issu de la collision des plaques ibérique et eurasiatique qui a débuté il y a environ 75 millions d'années durant le Campanien (Crétacé supérieur). La chaîne de montagne pyrénéenne est composée de roches sédimentaires, magmatiques et métamorphiques. Les Pyrénées s'étendent selon la direction est-ouest, sur une distance approximative de 430 km. Les tourbières étudiées sont localisées dans la partie centrale des Pyrénées, à la frontière entre la France, l'Espagne et l'Andorre. Ces dernières sont situées dans des zones formées à la suite de l'érosion glaciaire du quaternaire, avec des cirques glaciaires typiques et des vallées en forme de U. La carte ci-dessous représente la localisation géographique des quatre tourbières.

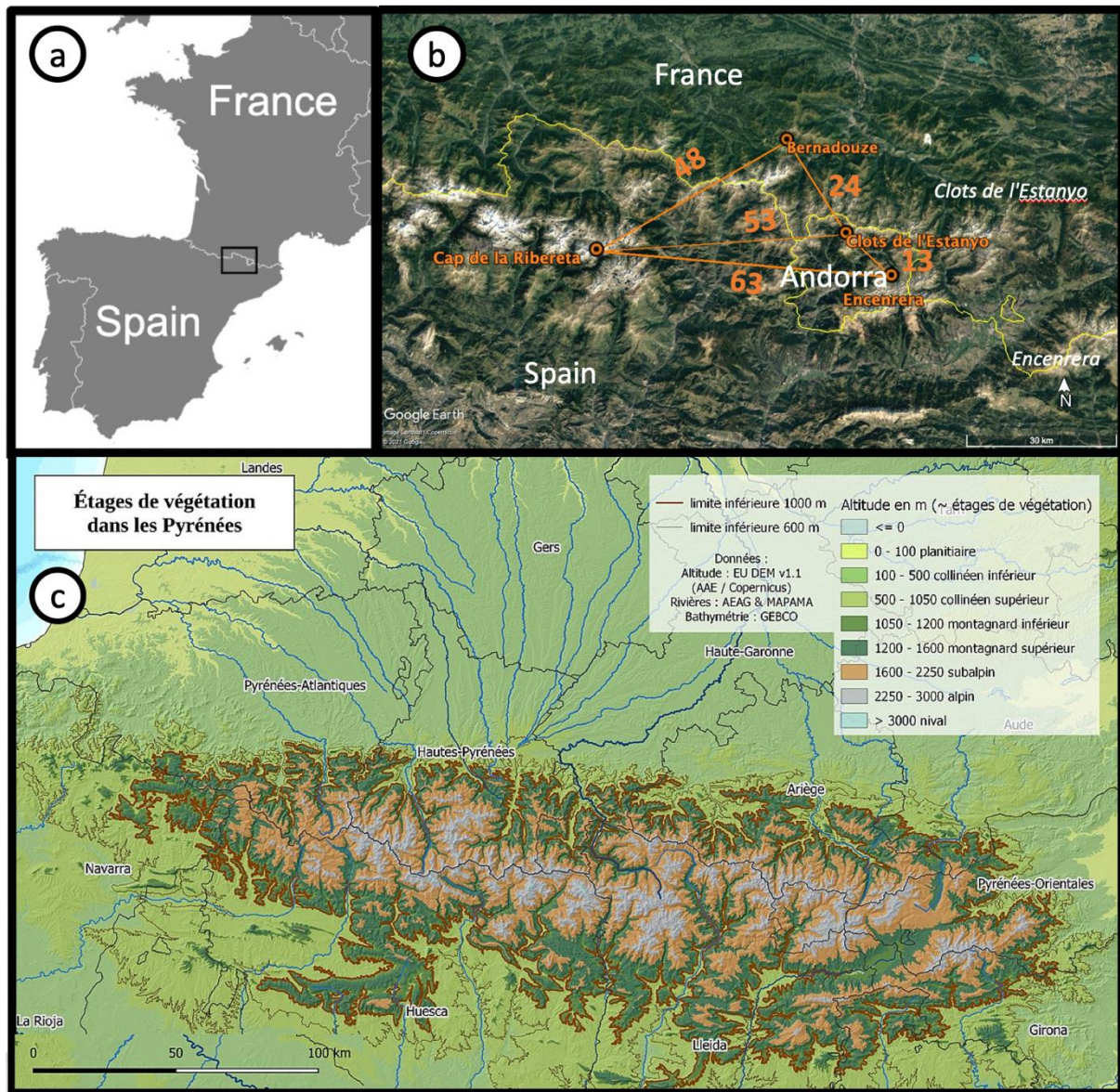


Figure III.1. Localisation géographique des tourbières.

(a) vue générale de la localisation des tourbières (b) localisation des quatre tourbières étudiées. Les chiffres représentent la distance géographique, exprimée en km. La ligne jaune montre la frontière entre la France, l'Espagne et la principauté d'Andorre. Les chiffres représentent la localisation de chaque tourbière (c) carte des étages de végétation dans les Pyrénées, adaptée de Gruber, (1981).

III.1.2. Présentation de la tourbière de l'Encenrera (Andorre) et prélèvement de tourbe

Le site de l'Encenrera est une tourbière de la principauté d'Andorre (42.530798N, 1.686603E), localisée à l'est de la principauté d'Andorre (Figure III.1), à proximité de la frontière entre la France et l'Espagne. Située à 2365 m d'altitude, elle couvre une superficie de 17196.79 m². C'est une tourbière de type minerotrophe oligotrophe, formée à partir d'un écoulement lent et continu le long d'une faible pente

(soligène ou tourbière basse). Elle est principalement alimentée par des eaux d'origine atmosphérique (pluies, neige, brouillard), de ruissellement et souterraine. Elle est dominée majoritairement par *Carex fusca* (Figure III.2) et *Sphagnum capillifolium* mais on y trouve aussi *Carex davalliana*, *Scirpus cespitosus* et des graminées. Les activités humaines détectées aux alentours de la tourbière sont le tourisme, les loisirs et l'élevage (DMA, 2005).

Le prélèvement de tourbe a été effectué à l'aide d'un carottier de type box-corer (1 m x 10 cm x 10 cm), dans une pelouse herbacée le 19 septembre 2017. De retour au laboratoire, la carotte a été congelée entière à -20°C.



Figure III.2. La tourbière de l'Encenera (altitude 2365 m), Andorre.

1- Vue générale, 2- Zone échantillonnée. 3-Prélèvement.

III.1.3. Présentation de la tourbière du Clots de l'Estanyo (Andorre) et prélèvement de tourbe

Le site du Clots de l'Estanyo est également une tourbière andorrane (42.6127N, 1.57392E), localisée au nord-est de la principauté d'Andorre (Figure III.1), proche de la frontière avec la France. Elle est située à 2575 m d'altitude, elle couvre une superficie de 17735.1 m². C'est une tourbière de type minérotrophe, de formation soligène, alimentée par des eaux d'origine atmosphérique, souterraine et de ruissellement. Elle est dominée majoritairement par *Scirpus cespitosus*, *Carex fusca*, et des bryophytes acidophiles (*Sphagnum*

sp.) (Figure III.3), mais on y trouve également des prairies de nard (*Nardus stricta*). Les activités humaines détectées dans la zone sont : le tourisme, les loisirs, le passage de chevaux, l'élevage bovin (DMA, 2005).

Le prélèvement a été effectué à l'aide d'un carottier de type box-corer (1 m x 10 cm x 10 cm). Deux carottes ont été prélevées (CEST₁, CEST₂) dans des buttes de sphaigne le 20 septembre 2017. Les carottes ont été congelées entières à -20°C.

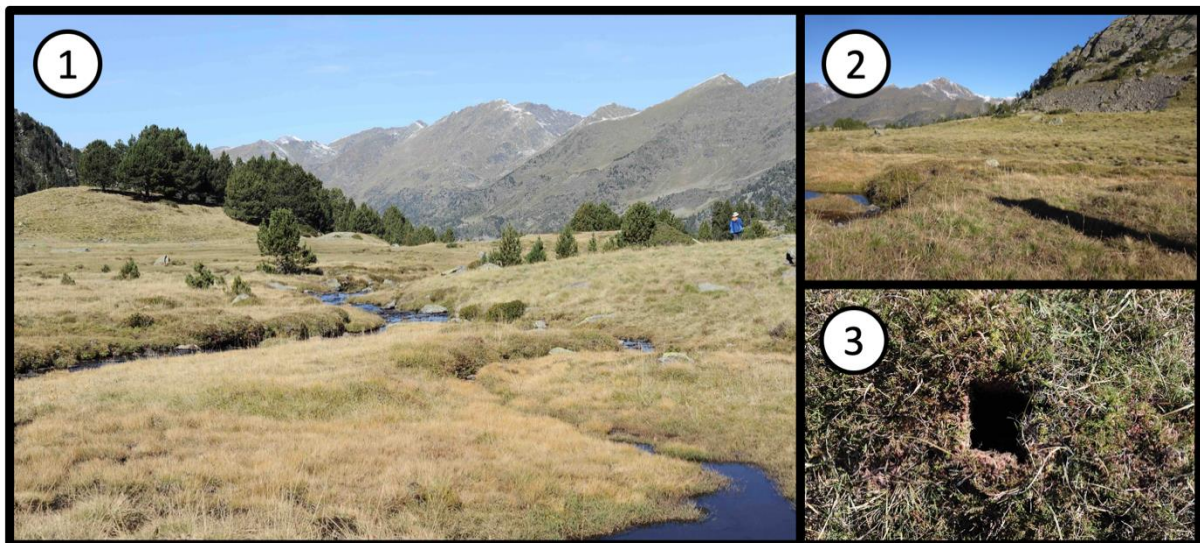


Figure III.3. La tourbière du Clots de l'Estanyo (altitude 2575 m), Andorre.

1- Vue générale, 2- Zone échantillonnée. 3-Prélèvement.

III.1.4. Présentation de la tourbière d'Aigüestortes (Espagne) et prélèvement de tourbe

Le troisième site est une tourbière localisée dans le parc national d'Aigüestortes (Figure III.1), située à 2300 m d'altitude (42.5805556N, 0.92499999E) et couvre une superficie de 1.6 ha. Le climat y est de type montagnard atlantique, avec des précipitations abondantes toute l'année (entre 1 200 et 1 300 mm) et une moyenne mensuelle généralement supérieure à 100 mm. Les températures sont basses, avec une moyenne annuelle de 5,2 °C et une amplitude thermique de 16 °C (source : <https://deims.org/>). Il s'agit d'une tourbière de type minerotrophe, également de formation soligène, alimentée par des eaux d'origine atmosphérique, souterraine et de ruissellement. Le prélèvement a été effectué à l'aide d'un carottier de type box-corer (1 m x 10 cm x 10 cm). Deux carottes ont été collectées dans une butte de sphaigne (AYG₁) et une dans une pelouse de sphaigne près d'un petit ruisseau (AYG₂) le 28 septembre 2017 (Figure III.4). Les carottes ont été congelées entières à -20°C.

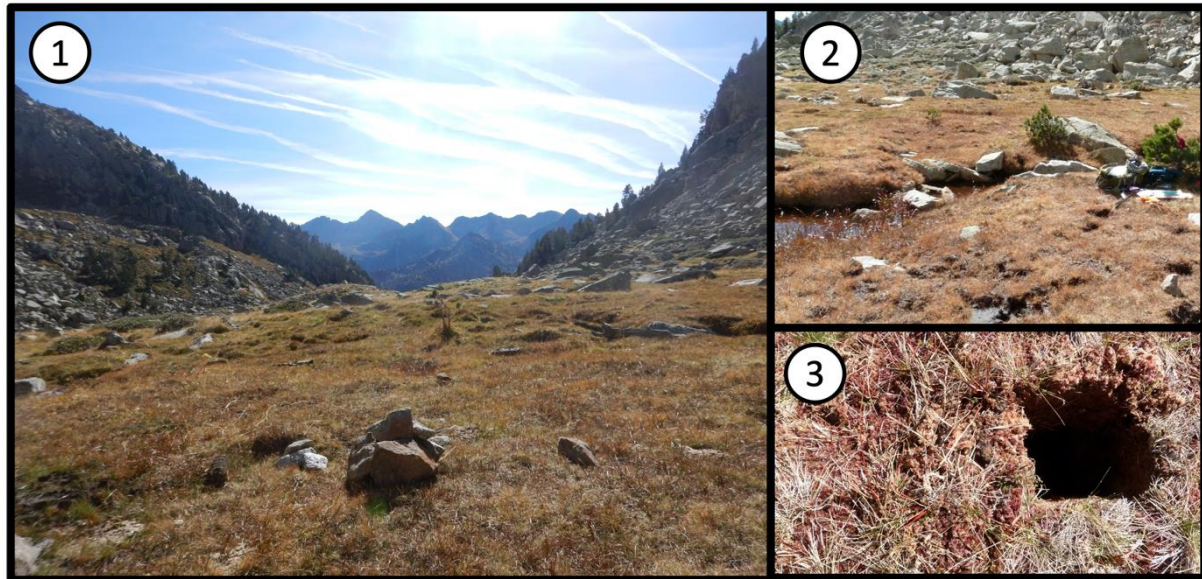


Figure III.4. La tourbière d'Aigüestortes (altitude 2300 m), Espagne.

1- Vue générale, 2- Zone échantillonnée. 3-Prélèvement.

III.1.5. Protocole de découpe des carottes de tourbe

Avant d'être congelées, les carottes ont été mesurées, photographiées (Figure III.5) et emballées dans des bâches en plastique neuve, de façon à prévenir toute contamination éventuelle.

1

Encenrera

ENC1 (92 cm)



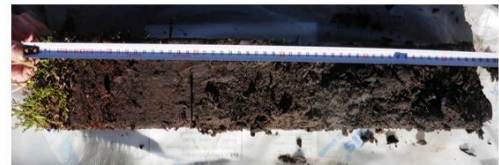
2

Clots de l'Estanyo

CEST1 (68 cm)



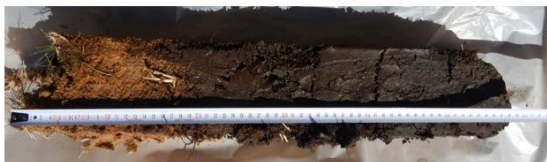
CEST2 (41 cm)



3

Cap de la Ribereta

AYG1 (60 cm)



AYG2 (37 cm)



Figure III.5. Carottes prélevées dans les tourbières d'Andorre et d'Espagne.

Pour chaque tourbière, les chiffres entourés sont les numéros qui permettent de localiser les tourbières sur la carte de la Figure III.1. Au-dessus de chaque photographie, les identifiants sont les mêmes que ceux utilisés dans la partie n°4. La taille des carottes exprimée en cm est indiquée entre parenthèses. Sur la figure, la taille des photographies est proportionnelle à la taille de chaque carotte.

Les carottes congelées ont été sectionnées à l'aide d'une scie à ruban par tranche de 1 cm (Figure III.6). Chaque tranche a été mesurée (longueur, largeur et épaisseur) puis découpée en 5 fractions de façon à pouvoir effectuer les analyses géochimiques et moléculaires. Les tranches ont été stockées dans des sachets individuels au congélateur à -20°C. Les échantillons ont ensuite été homogénéisés par broyage dans un mortier en porcelaine avec de l'azote liquide et conservés à -20 °C pour l'extraction de l'ADN. Ces

échantillons ont été ensuite regroupée tous les 2 cm pour les 10 premiers centimètres de carotte, puis tous les 5 cm entre 10 cm et le bas de la carotte. Finalement, cela représente 12, 16 et 21 échantillons pour les plus longues carottes (c'est-à-dire AYG₁, CEST₁ et ENC, respectivement), 9 et 10 pour les carottes les plus courtes (c'est-à-dire AYG₂ et CEST₂, respectivement).

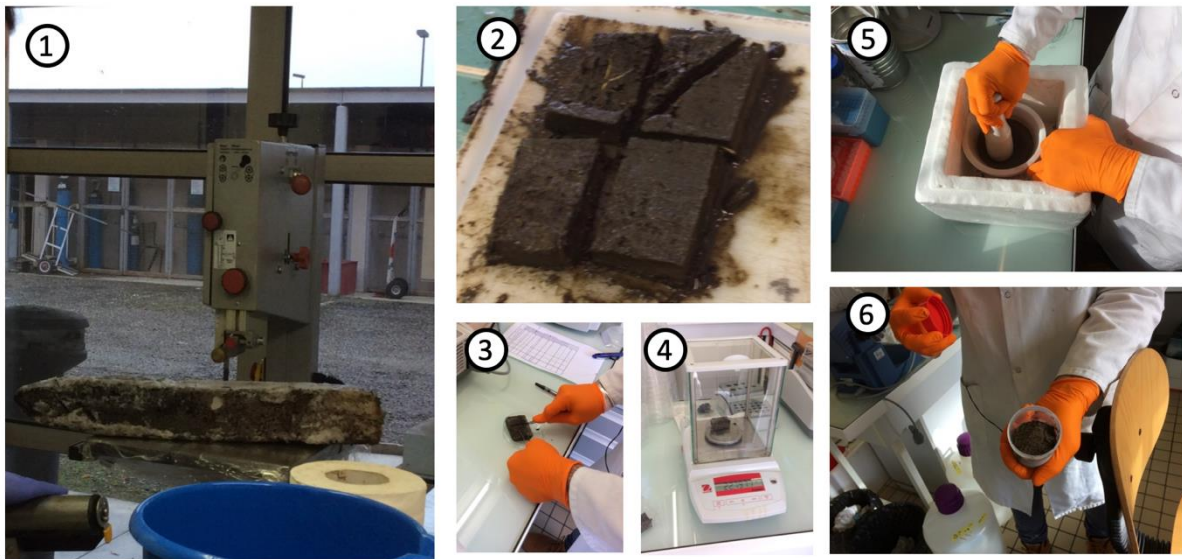


Figure III.6. Étapes de préparation des échantillons.

Numérotées de 1 à 6, les photographies montrent successivement (1) la scie à ruban qui a permis de découper les carottes en tranches de 1 cm en moyenne (2) le découpage de chaque tranche en quartier pour la mesure des paramètres physico-chimiques et analyses moléculaire (3)-(4) découpage et pesée de chaque tranche de façon à homogénéiser la même quantité d'échantillon (5) homogénéisation des échantillons à l'aide d'un pilon et d'un mortier en porcelaine dans l'azote liquide (6) broyat final destiné à l'extraction d'ADN.

III.2. Description de la tourbière de Bernadouze (France) et prélèvements de tourbe

La tourbière de Bernadouze (42.80247 N, 1.42333 E) est située dans la haute vallée du Vicdessos en Ariège (**Figure III.7**), à 1345 m d'altitude dans la partie orientale des Pyrénées françaises. Réserve biologique depuis 1983, elle fait partie de la zone Natura 2000 « Mont Ceint, Mont Béas, tourbière de Bernadouze ». Il s'agit d'une petite tourbière de 4,7 ha avec une profondeur moyenne de tourbe de 2 m, mais pouvant dépasser 9 m à certains endroits (Jalut et al., 1982). C'est une tourbière mixte soligène, qui abrite à la fois des zones ombrotrophes et minérotrophes. Elle est sous l'influence d'un bassin-versant de 1,4 km² composé principalement de roches calcaires. Elle a débuté sa formation à partir d'un lac postglaciaire, où un marais s'y est développé pendant 10 000 ans (Reille, 1990). Orientée à l'est, elle est soumise à l'influence océanique, mais les conditions météorologiques peuvent être contrastées en raison de la topographie

montagneuse spécifique. La température annuelle moyenne enregistrée pour les années 2015 à 2018 était de $7,9 \pm 0,3$ °C et les précipitations annuelles moyennes étaient de 1797 ± 265 mm. Des températures sous zéro et des chutes de neige sont fréquemment observées à Bernadouze de la mi-octobre à la mi-mai (Rosset et al. 2020). Le site de Bernadouze est dominé par des sphaignes (*Sphagnum subnitens*, *Sphagnum compactum*) associées à d'autres espèces telles que *Carex demissa* ou *Equisetum fluviatile*.

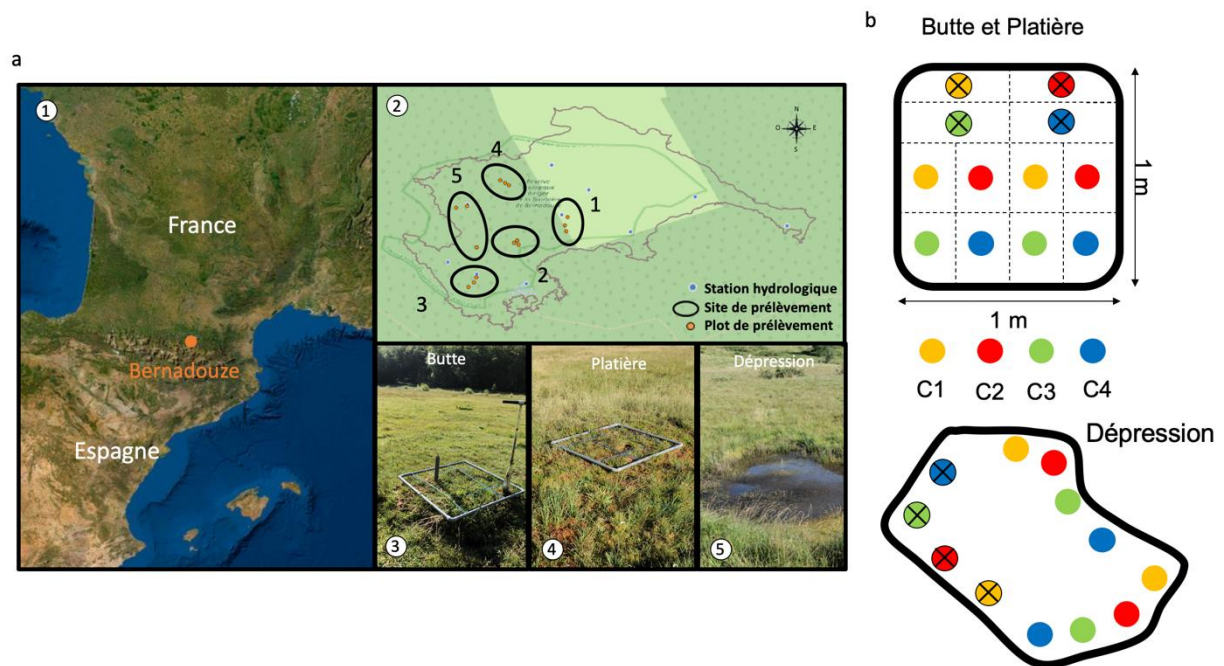


Figure III.7. La tourbière de Bernadouze (altitude 1345m), France.

*a1 - localisation géographique, a2- sites échantillonnés, situation des stations hydrologiques (piézomètres)
a3, 4 et 5 – micro-habitat typique de tourbières observé sur le site : butte, platière et dépression b - pour
chaque campagne d'échantillonnage (C1,C2,C3,C4), les prélèvements ont été effectués en triplicat à
l'intérieur du quadra pour les buttes et les platières, puis en périphérie pour les dépressions.*

La tourbière de Bernadouze se trouve dans un territoire pastoral. La présence de bovins y est régulièrement observée (plutôt sur la partie nord-est) ainsi que du tourisme et des activités périscolaires. Son instrumentation a débuté en 2011 et se poursuit depuis dans le cadre des activités du SEEGMA Bernadouze (Site d'Etude en Ecologie Globale – Milieux Anthropisés-OHM Pyrénées Haut Vicdessos-Labex DRIIHM). On y dénombre une station météorologique et un réseau de 10 piézomètres. Plusieurs études y ont été menées afin d'acquérir des données sur le fonctionnement de la tourbière avant qu'une coupe forestière n'ait lieu sur le versant en amont de la tourbière (septembre 2016). Ces mesures se sont poursuivies afin d'évaluer l'impact de la coupe forestière sur le fonctionnement de la tourbière. Depuis, elle fait l'objet d'un suivi régulier par le laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement notamment (ECOLAB, CNRS - INP Toulouse). Récemment, elle a fait l'objet d'une thèse qui a eu pour objectif de

quantifier les exportations de matière organique (Carbone Organique Dissous, COD ; Carbone Organique Particulaire, COP) et d'identifier les paramètres qui contrôlent ces exportations. En complément de l'instrumentation décrite ci-dessus, deux sondes multi-paramètres immergées ont été placées en amont et à l'exutoire de la tourbière, de façon à pouvoir quantifier les apports et les exports de carbone particulaire et dissous (Rosset,2019).

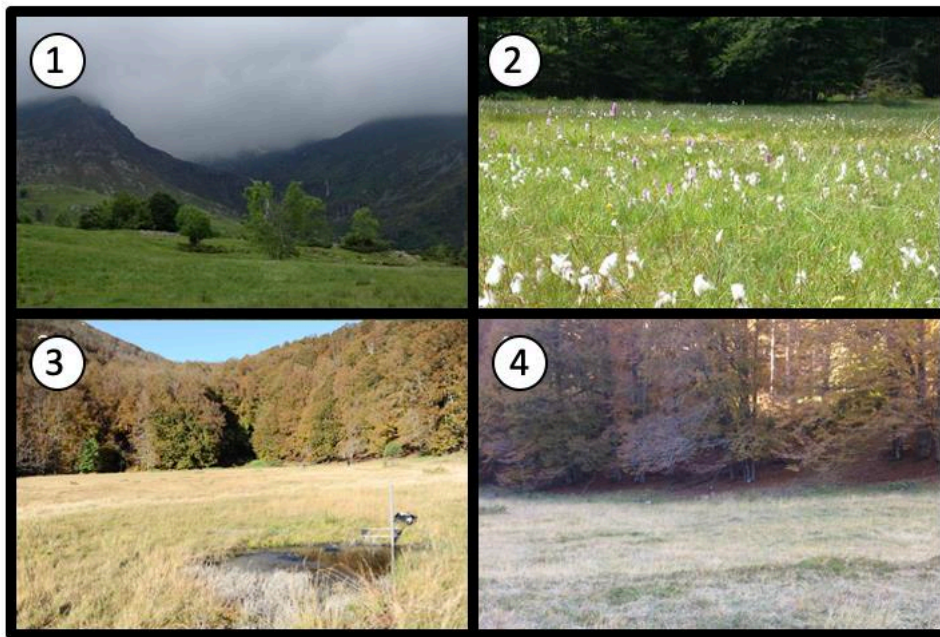


Figure III.8. La tourbière de Bernadouze au cours des quatre campagnes de prélèvement.

1- printemps (12-13 juin 2018), 2- début de l'été (2-5 juillet 2018), 3- fin de l'été (4-5 septembre 2018), 4- automne (22_25 octobre 2018).

Des échantillons de tourbe ont été obtenus à partir de quatre campagnes d'échantillonnage réalisées en 2018, les 12-13 juin, juste après la fonte des dernières plaques de neige, les 2-5 juillet au début de l'été, 4-5 septembre en fin d'été et 22-25 octobre en automne (**Figure III.8**). Pour chaque campagne, cinq zones différentes ont été échantillonnées, elles ont été choisies afin de couvrir au mieux l'hétérogénéité du site. Dans chaque zone, nous avons échantillonné les trois microhabitats communément rencontrés dans les tourbières : les buttes, les platières et les gouilles. Sur chaque microhabitat, l'échantillonnage a été réalisé en triplicat à l'aide d'un quadrat d'un mètre carré (**Figure III.7.b**). Nous avons prélevé trois carottes de tourbe à l'aide d'un carottier russe (5 cm × 50 cm). Le carottage a été effectué deux fois, de façon à atteindre une profondeur de 1 m. Pour chaque carotte, nous avons considéré trois profondeurs : 0-15 cm (surface), 35-50 cm (fluctuation de la nappe) et 85-100 cm (zones gorgées d'eau) (**Figure III.9**). À chacune des trois

sections, nous avons dans un premier temps mesuré la température puis nous avons prélevé un échantillon de tourbe dans un eppendorf® de 5 ml au centre de chaque section qui a été directement transféré dans un cryo-transporteur portable d'azote liquide pour les analyses moléculaires. Un volume prédéfini de tourbe a été également prélevé à l'aide d'un emporte-pièce afin de déterminer ultérieurement la densité de la tourbe et un autre morceau de tourbe a été collecté et presser pour récolter l'eau interstitielle afin d'effectuer une mesure de pH directement sur le terrain. Le reste des triplicats de tourbe a été placé dans un sachet, homogénéisé puis conservé à 4°C. Au total, 180 échantillons ont été analysés (4 campagnes x 5 zones x 3 habitats x 3 profondeurs) (Figure III.7).

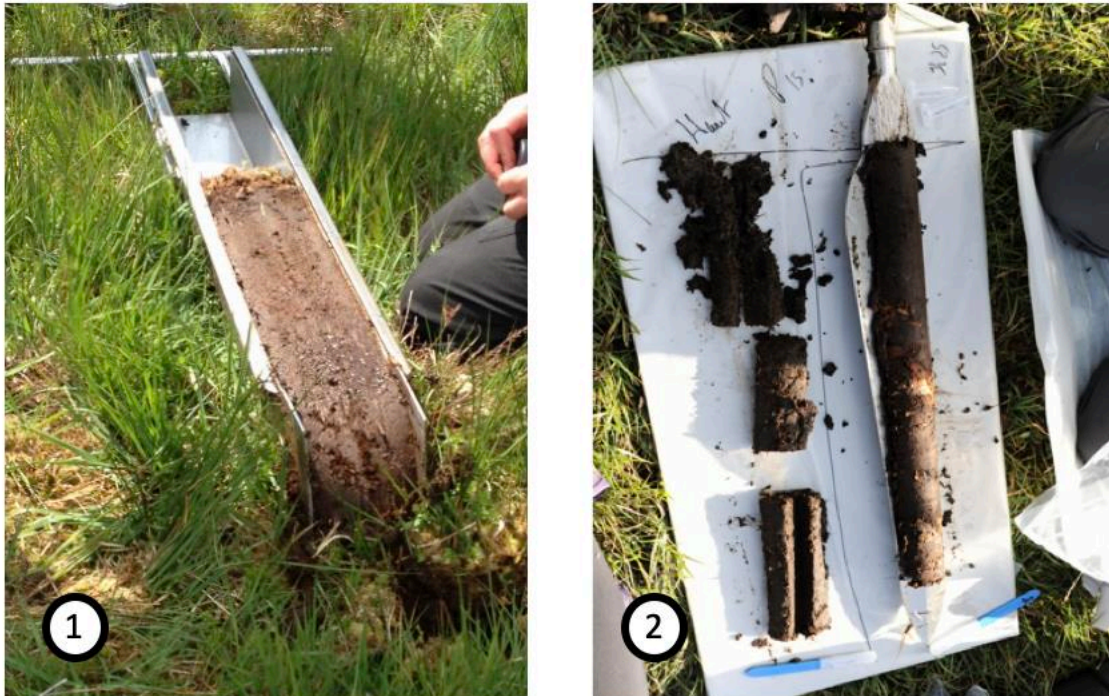


Figure III.9. Carottiers utilisés pour collecter les échantillons.

1- carottier de type box-corer utiliser pour prélever les échantillons dans les tourbières espagnoles et andorranes 2 - carottier russe utilisé à Bernadouze. La photographie n°2 montre en détail le sous-échantillonnage par section de 15 cm des carottes de 1 mètre

Pour les analyses métagénomiques non-ciblées (shot-gun Illumina et Pacbio), un sous-échantillonnage des 180 échantillons précédemment collectés a été effectué. Afin d'obtenir la plus grande diversité microbienne possible, 24 échantillons ont été sélectionnés. Pour cela, nous avons tenu compte à la fois des paramètres environnementaux (e.g. le pH, le rapport C/N, les nutriments), des indices de diversité (alpha et beta diversité) obtenus sur l'ARN16S, mais nous avons également cherché à maintenir notre design

expérimental. Ainsi les échantillons des zones 2 (fen oligotrophe), 3 (bog) et 5 (fen eutrophe) ont été retenus. Les buttes des trois profondeurs ont été séquencées, ainsi que la surface de chaque gouille aux deux saisons les plus contrastées : juste après la fonte des neiges au printemps (froid et humide) et à la fin de l'été (chaud et sec).

III.3. Caractérisation des paramètres physico-chimiques

III.3.1. Mesure des paramètres géochimiques dans les tourbières d'Andorre et d'Espagne

Sur chaque site, le niveau instantané de la nappe a été enregistré environ une heure après le carottage. Cette mesure doit cependant être considérée avec prudence car la nappe peut parfois mettre plusieurs heures pour revenir à son niveau initial. La conductivité, l'oxygène dissous (OD), la température et le pH des échantillons d'eau de la nappe de AYG₁₋₂, CEST₁₋₂ et ENC ont été mesurés sur le terrain à l'aide de sondes WTW (ConOX et Sentix 40). Un autre échantillon d'eau provenant de la nappe a été collecté pour des analyses géochimiques complémentaires.

Ces échantillons d'eau interstitielle ont été filtrés à l'aide de filtres en acétate de cellulose de 0,22 µm GSWPo₄₇₀₀ puis acidifier à pH 2 (Merck-Millipore, États-Unis). La concentration en COD a été analysée dans les échantillons filtrés et acidifiés avec un analyseur TOC-5000A (Shimadzu, Japon). Pour les échantillons de tourbe, un sous-échantillon de chaque section a été pesé (poids humide) et ensuite lyophilisé pour obtenir le poids sec. La densité apparente a été déterminée en divisant le poids sec par le volume du sous-échantillon et la teneur en eau a été calculée comme étant le poids humide moins le poids sec divisé par le poids humide. Un autre sous-échantillon a été utilisé pour déterminer le carbone organique total et l'azote ainsi que le rapport C/N à l'aide d'un analyseur élémentaire FLASH 2000 ThermoFisher™.

III.3.2. Mesure des paramètres géochimiques dans la tourbière de Bernadouze

Pour chaque échantillon de tourbe, la température et le pH ont été mesurés sur le terrain à l'aide d'un thermomètre numérique de sol Taylor® et une sonde Multiparamètre MultiLine WTW® 3510 (sonde Sentix 940) respectivement. Pour qualifier la matière organique de la tourbière, le rapport C/N a été calculé directement sur les échantillons de tourbe par combustion. Le carbone organique total et l'azote total ont été mesurés avec un analyseur élémentaire FLASH 2000 ThermoFisher™. Sur chaque site, la profondeur de la nappe a été enregistrée à l'aide de piézomètres, installés lors de chaque campagne d'échantillonnage dans un des trous de prélèvement (voir **Figure III.7**). Les mesures ont été effectuées entre 1 et 2 jours après l'installation du piézomètre.

Le COD, le TON (azote organique total) et les ions majeurs ont été mesurés à partir d'une extraction à l'eau en respectant le rapport 1/5 (w/v). Après agitation pendant 2h à 150 tr/min, l'homogénat a été préfiltré à l'aide d'une pompe à air électrique sur un tissu filtrant en nylon Nitex Ø 80 µm (**Figure III.10**). Ensuite, l'extrait d'eau a été centrifugé pendant 20 min à 4000 tr/min, puis filtré à deux reprises sur des filtres GF/A puis GF/F suivi de filtration sur filtre 0,45 µm puis 0,2 µm. Les échantillons destinés au dosage de COD et TON ont été acidifiés à pH 2. Le COD et le TON ont été quantifiés à l'aide d'un analyseur TOC-5000A (Shimadzu, Japon). La quantité de nutriments a été évaluée à partir des principaux cations et anions (notamment NO_2^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , NH_4^+ , PO_4^{3-}), quantifiés par chromatographie ionique à haute performance (Dionex Ics-5000+ (Anions) ; Dionex DX-120 (Cations)).

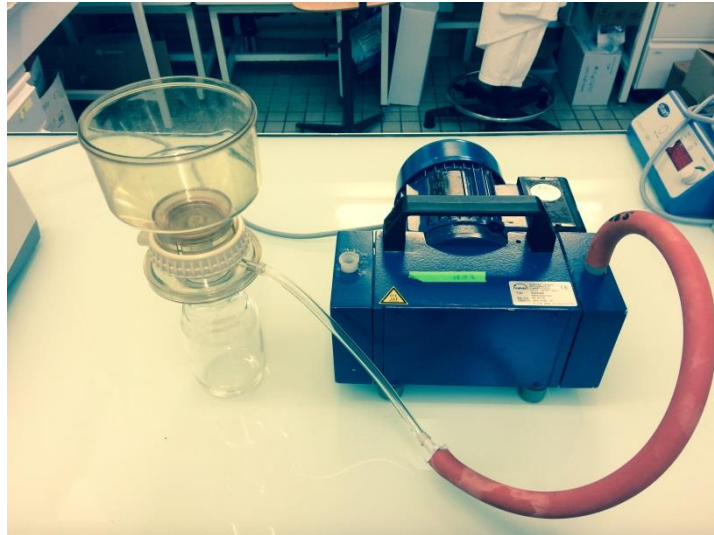
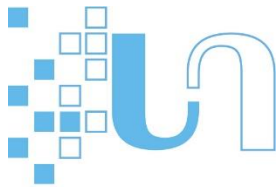


Figure III.10. Unité de filtration utilisée pour filtrer les échantillons de tourbe.

III.3.3. Extraction du phénol et des phénols libres

Dans les tourbières, de grandes quantités de phénols hydrophiles sont susceptibles d'être libérés par les sphaignes. Ces composés vont interagir avec les différents composants de l'environnement, mais aussi avec les microorganismes. Les phénols peuvent avoir des actions inhibitrices sur les microorganismes impliqués dans la décomposition de la matière organique (Verhoeven and Liefveld, 1997). À Bernadouze, les phénols totaux (liée à la sphaigne et solubles dans l'eau) et les phénols libres (solubles dans l'eau) ont été quantifiés via deux méthodes distinctes.



Les phénols libres ont été estimés à partir d'extrait d'eau. En bref, 30 g de tourbe ont été ajoutés à 150 ml d'eau Milli-Q de qualité ultra-pure et agités pendant 1h. Ensuite, 200 µL de cet extrait ont été mélangés à 10 µL de réactif Folin-Ciocalteu (2M) et 30 µL de Na₂CO₃ (100 g/L) dans des microplaques de 96 puits. Après incubation pendant 30 min à 40°C, la longueur d'onde d'absorbance a été mesurée à 765 nm à l'aide de l'appareil de lecture multimode Synergy HTX. Une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant des concentrations de 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 et 60 mg/L d'acide gallique. Le contenu phénolique est exprimé en mg équivalents d'acide gallique par g de poids sec de tourbe. Ce sont ces valeurs de phénols qui ont été utilisées dans la partie 5.

Pour quantifier les phénols totaux, les phénols de la tourbe ont été extraits à l'aide de solvant. Cette expérience a fait l'objet de nombreuses recherches, différents solvants (éthanol, acétone, méthanol) ont été testés, avec ou sans HCl, en faisant varier le temps d'incubation et la température. Ici, est présenté le protocole optimisé. En respectant le rapport 1/100 (m/v), une solution de méthanol, d'H₂O et d'HCl (75/24,5/0,5) a été ajoutée à de la tourbe fraîche. Après agitation à 160 tr/min dans l'obscurité pendant 2 heures et à 35 °C, les échantillons ont été centrifugés à 5000 tr/min pendant 10 min à 20 °C. Dans des microplaques de 96 puits, le produit d'extraction a été dilué avec de l'eau en respectant le rapport 1/10 (v/v) et ajouté à 10 µl de réactif Folin-Ciocalteu (2M) puis mélangé et incubé à température ambiante pendant 2 min. Ensuite, 30 µL de Na₂CO₃ (100 g/L) ont été ajoutés et incubés pendant 2 heures à 20°C. La longueur d'onde d'absorbance a été mesurée à 765 nm à l'aide de l'appareil de lecture multimode Synergy HTX. La courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant des concentrations de 0, 50, 100, 150, 250 et 500 mg/l d'acide gallique diluées au 1/80. Le contenu en phénols est exprimé en mg équivalents d'acide gallique par g de poids sec de tourbe.

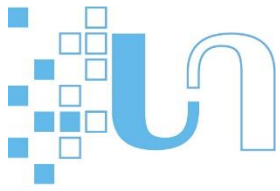
III.3.4. Estimation de l'espace disponible pour l'oxygène

L'espace disponible pour l'oxygène (WFPS) a été estimé à partir des formules suivantes :

$$\text{Teneur en eau du sol (g/g)} = \frac{\text{Poids humide du sol} - \text{Poids sec du sol}}{\text{Poids du sol humide}}$$

$$\text{Masse volumique apparente du sol (g/cm}^3\text{)} = \frac{\text{Poids sec du sol}}{\text{Volume du sol}}$$

$$\text{Espace poreux rempli d'eau du sol (\%)} = \frac{\text{Teneur en eau du sol} * \text{Densité apparente du sol} * 100}{\text{Porosité du sol}}$$



$$\text{Porosité du sol (\%)} = 1 - \frac{\text{Densité apparente du sol}}{1,5}$$

La tourbe sèche a été obtenue après 48h dans une étuve à 80°C.

III.3.5. Activités enzymatiques

Pour quantifier l'activité potentielle des communautés microbiennes présentes dans chaque échantillon, des mesures d'activités enzymatiques ont été effectuées sur les 180 échantillons. Les cinq enzymes qui ont été suivies sont : phénol oxydase, peroxydase, β -glucosidase, phosphatase et chitinase. La première est impliquée dans la dégradation des produits phénoliques, la deuxième dans la dégradation de la lignine, la troisième est une enzyme extracellulaire appartenant au sous-groupe des glycosides hydrolases et impliquée dans la dégradation de courtes chaînes de polymère de cellulose pour produire du glucose, la quatrième est une hydrolase clivant les liaisons phosphoesters et libérant un groupe hydroxyle et un phosphate, et la cinquième est impliquée dans la dégradation de la chitine.

Les activités enzymatiques des polyphénols oxydases ont été quantifiées via l'activité de la laccase et de la peroxydase en utilisant le 2,2'-Azino-bis(acide 3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique) (ABTS) comme substrat. Cette expérience a également fait l'objet de nombreuses mises au point. Notamment, je me suis rendu au laboratoire écologie fonctionnelle et environnement (ECOLAB à Toulouse, France) pour mettre au point un certain nombre de paramètres auprès du Dr Vincent Jassey. Deux tampons (acétate et phosphate) et deux substrats (L-DOPA et l'ABTS) ont été utilisés. Une optimisation des paramètres d'incubations (température, temps d'incubation) a été effectuée afin d'obtenir le résultat le plus précis et la plus grande reproductibilité possible. Ici, il est présenté le protocole qui a été sélectionné pour faire les analyses.

En bref, 50 ml de tampon acétate (0,1 M, pH = 4) ont été mélangés à 0,5 g de tourbe fraîche. Dans une plaque de 96 puits, 200 μ L de solution ont été mélangés avec 50 μ L d'ABTS (0,1 M) et incubés dans l'obscurité pendant 15 minutes à 21°C puis agités sur un agitateur orbital à 150 tours/minute. L'activité enzymatique de la peroxydase a été estimée en utilisant le même protocole, en ajoutant 10 μ L de H₂O₂ (0,3%) à la réaction. La réaction a été arrêtée par centrifugation à 5700 tr/min pendant 5 min à 21°C. La longueur d'onde de fluorescence a été mesurée à 420 nm dans 150 μ L de solution à l'aide de l'appareil de lecture multimode Synergy HTX (**Figure III.11**). La courbe d'étalonnage pour l'activité phénol oxydase a été réalisée en mélangeant 196 μ L d'acétate buffer à 4 μ L de laccase (une unité diluée au 1/100, n°L5510-Sigma) et 0.04, 0.12, 0.2, 0.32, 0.44, 0.4, 0.8 et 1 mM d'ABTS. La courbe d'étalonnage pour l'activité peroxydase a été réalisée en mélangeant 145 μ L d'acétate buffer à 55 μ L de laccase (une unité diluée au

1/100, n°L5510-Sigma) et 0.04, 0.16, 0.32, 0.6, 0.8, 1.2, 1.6 et 2 mM d'ABTS. Les activités phénol oxydase et peroxydase sont exprimées en μmol d'ABTS dégradé/min/g de tourbe sèche.

Les activités enzymatiques de la phosphatase, de la chitinase et de la β -glucosidase ont été quantifiées conformément aux normes DD ISO TS 22939:2010 de la Buy British Standards (BSI).

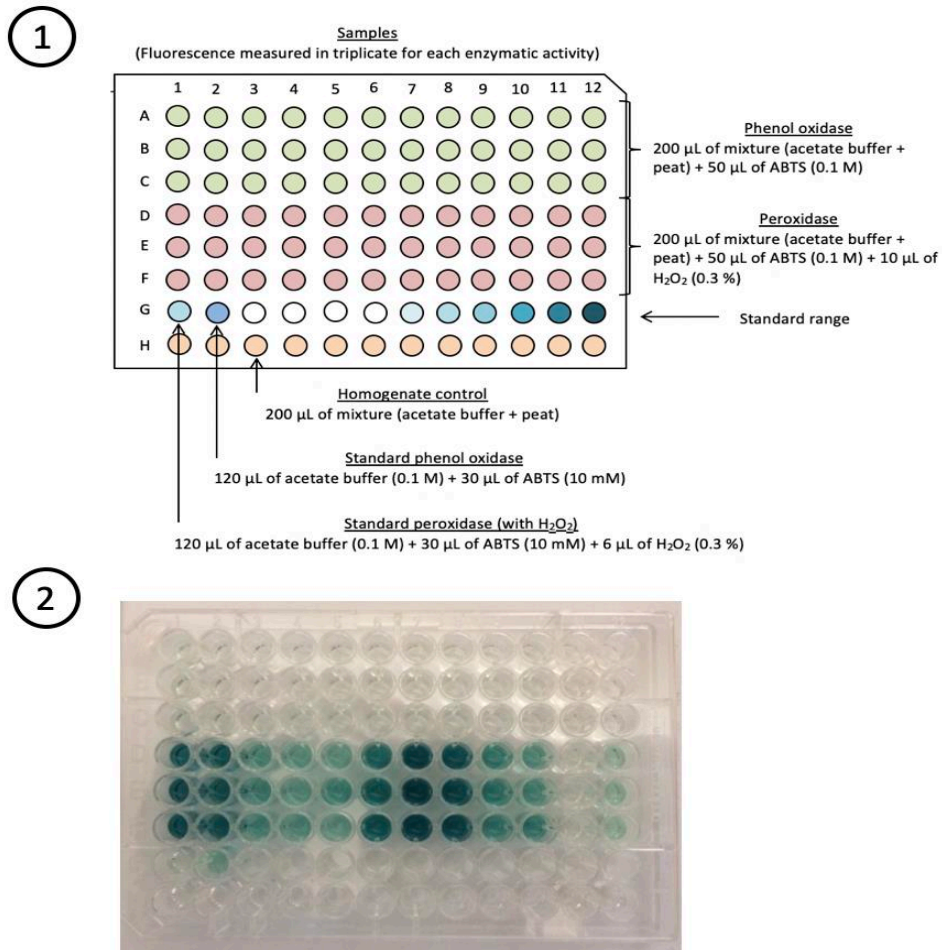
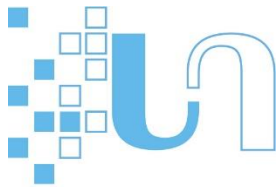


Figure III.11. Mesure des activités enzymatiques.

1- ici l'exemple pour l'activité phénol oxydase et peroxydase 2- exemple de résultats obtenus

III.4. Séquençage d'amplicons 16S rRNA: analyses moléculaires et traitement bioinformatique

Les protocoles détaillés ci-dessous ont été utilisés pour les échantillons des quatre tourbières étudiées durant cette thèse.



III.4.1. Présentation du séquençage du gène codant l'ARNr 16S

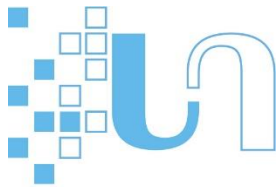
La grande majorité des micro-organismes ne peuvent pas être cultivés en laboratoire en raison de la limite des approches conventionnelles basées sur la culture. Pendant longtemps, nos connaissances de la diversité microbienne et de la physiologie étaient basées sur quelques organismes modèles, et étaient donc fortement biaisées. Pour commencer à comprendre le fonctionnement des écosystèmes microbiens, il était nécessaire de développer des techniques indépendantes de la culture pour évaluer les communautés microbiennes *in situ*. Le metabarcoding est aujourd'hui largement utilisé pour séquencer le gène codant pour l'ARNr 16S, un gène présent dans toutes les cellules Procaryotes, qui peut être ciblé à l'aide d'amorces PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne) universelles en raison de la présence de régions conservées. De plus, à l'aide d'outils bioinformatiques simples tels que QIIME2 (Bolyen et al., 2019), il est possible d'identifier rapidement la séquence environnementale par rapport à des bases de données telles que Greengenes (DeSantis et al., 2006), RDP (Maidak, 2000) et SILVA (Yilmaz et al., 2014) qui contiennent des centaines de milliers de séquences de référence d'ARNr 16S d'organismes cultivés et surtout non-cultivés, et obtenir une classification taxonomique et phylogénétique.

III.4.2. Extraction de l'ADN, amplification PCR et séquençage

L'ADN a été extrait à l'aide du kit d'isolation d'ADN PowerSoil (laboratoires MoBio) conformément aux recommandations du fabricant. Un fragment de 413 pb ciblant la région hypervariable V3-V4 du gène codant pour l'ARNr 16S des bactéries et des archées a été amplifié avec les amorces suivantes : 515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTA-3') et 928R (5'-CCCCGYCAATTCMTTTRAGT-3'). Une PCR a été effectuée avec les paramètres suivants : 95°C pendant 10 min, suivie de 25 cycles de 95°C pendant 30 s, 60°C pendant 30 s et 72°C pendant 40 s, suivi par une étape finale d'élongation à 72°C pendant 10 min. La bibliothèque a ensuite été séquencée par une machine Illumina MiSeq Desktop Sequencer (Illumina Inc., CA, US) en utilisant le séquençage par paires avec le réactif MiSeq Reagent Kits v3 (Illumina Inc., CA, US) sur la plateforme GeT-PlaGe (Castanet-Tolosan, France).

III.4.3. Classification taxonomique et arbre phylogénétique

Le logiciel open source QIIME 2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) a été utilisé pour l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S. L'outil « Naive Bayes taxonomic classifiers2 » et la base de données SILVA v132 ont été utilisés pour regrouper les séquences en Séquences Variantes représentatives d'Amplicon (ASV) et réaliser l'assignation taxonomique. Les ASVs ont ensuite été utilisés pour construire des arbres phylogénétiques en utilisant le plugin de phylogénie QIIME 2 "align-to-tree-mafft-fasttree". Un



chronogramme a été généré à partir de l'arbre phylogénétique en utilisant la fonction "chronos" (paramètre par défaut) fournis dans la librairie R *ape* (Paradis, et al., 2004). Cette fonction permet d'obtenir un arbre ultramétrique (i.e. les extrémités des branches sont toutes équidistantes de la racine) daté en temps relatif (c'est-à-dire la racine à 1 et extrémité des branches à 0). Les arbres ont été utilisés pour les analyses de la diversité phylogénétique, spécifiquement développées dans la partie 4.

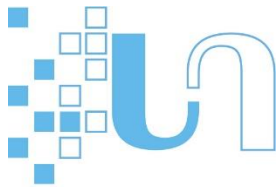
III.4.4. Prédiction des capacités métaboliques

Spécifiquement pour la partie 4, la composition fonctionnelle des échantillons a été prédite à l'aide de l'outil PICRUST version 2.3.0 (Douglas, et al., 2020). Dans un premier temps, PICRUST2 consiste à aligner les séquences d'ASV contre des séquences de référence en utilisant HMMER (<http://www.hmmerr.org/>) et à placer les ASVs dans un arbre phylogénétique de référence en utilisant les outils EPA-ng et GAPP (Barbera, et al., 2018, Czech, et al., 2020). La prédiction et l'abondance des familles de gènes par échantillon ont été effectuées en utilisant le package R *castor* (Louca and Doebeli, 2018) et les abondances des voies métaboliques ont été déduites en utilisant MinPath (Ye and Doak, 2009). Les voies métaboliques MetaCyc ont été inférées à partir de l'abondance des gènes prédits contre la KEGG database (<https://www.genome.jp/kegg/annotation/enzyme.html>), en utilisant les paramètres par défaut.

III.5. Séquençage métagénomique non-ciblée : analyses moléculaires et traitement bioinformatique

III.5.1. Les limites du séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S

Le metabarcoding est l'une des méthodes les plus couramment utilisées pour estimer rapidement et à moindre coût la diversité microbienne d'un échantillon. Cependant, certains problèmes potentiels doivent être pris en considération lorsque cette méthode est employée i.) certaines souches peuvent posséder plus de 97% d'identité au niveau de l'ARNr 16S et seront identifiées par certaines méthodes de regroupement comme appartenant à la même espèce en utilisant ce marqueur (Dufresne et al., 2003; Grote et al., 2012; Rocop et al., 2003), ii.) la variation du nombre de copies du gène de l'ARNr 16S et l'hétérogénéité intragénomique peuvent surestimer la diversité microbienne et l'abondance relative (López-Pérez et al., 2013), iii.) les amorces utilisées peuvent fortement biaiser l'amplification et certains taxons ne peuvent pas être détectés (Brown et al., 2015; Eloë-Fadrosh, 2016).



III.5.2. Les technologies de séquençage de seconde et troisième générations (NGS)

Le séquençage par « shot-gun » par la technologie Illumina implique une fragmentation aléatoire de l'ADN directement extrait d'échantillons environnementaux. Après la préparation de la librairie, des millions de fragments d'ADN sont massivement séquencés et réassemblés pour former des séquences génomiques. En interrogeant des bases de données, ces séquences permettent de connaître l'ensemble des gènes porté par la communauté microbienne de chaque échantillon. Cette approche permet d'étudier non seulement les microorganismes non-cultivés dans les échantillons environnementaux, mais aussi leurs fonctions associées. En plus d'augmenter l'exhaustivité de l'information collectée, ces méthodes évitent les biais inhérents aux approches plus traditionnelles. À partir des séquences obtenues, il est possible de reconstruire des génomes microbiens. Les lectures brutes (raw reads) séquencées (150 pb) sont d'abord assemblées en long contigs (jusqu'à plusieurs centaines de milliers de pb), et en utilisant les fréquences des tétranucléotides, le taux de GC, l'affiliation taxonomique et leurs valeurs de co-abondance, peuvent être regroupées en génomes (**Figure III.12**). Les protéines sont ensuite annotées à partir de base de données telle que COG, TIGRFAM ou KEGG afin d'identifier les métabolismes. L'abondance des génomes est estimée en alignant les lectures brutes contre les génomes. Cette approche est un outil pertinent pour identifier les organismes clés dans un écosystème et leur implication dans les cycles des nutriments (Woodcroft et al., 2018). Elle a également permis de découvrir un grand nombre de microorganismes peu abondants (Asgard, DPANN, Candidats Phyla Radiation (CPR)), de découvrir de nouvelles fonctions métaboliques et de repositionner les Eucaryotes dans l'arbre du vivant (Castelle and Banfield, 2018).

En 2011, Pacific Biosciences (PacBio) a commercialisé le « Single Molecule Real Time (SMRT) », une technologie permettant de séquencer des lectures très longues, de l'ordre de milliers à des centaines de milliers de bases. Pacbio long-read pour étudier le potentiel métabolique des microorganismes de Bernadouze. Le séquençage Pacbio Sequel II (« Single Molecule, Real-Time (SMRT) Sequencing technology ») permet de séquencer de façon précise des longs fragments d'ADN (10 millions de reads par échantillon de taille de 7 kb en moyenne), permettant de diminuer les erreurs liées à l'assemblage des lectures en génome. Elle permet aussi de séquencer à travers les îlots génomiques, c'est-à-dire des régions de composition d'ADN inhabituelle issues d'un transfert de gène horizontal, qui possèdent généralement les caractéristiques d'éléments mobiles d'ADN ou de « hot-spot » de recombinaison. À cause des séquences répétées, ces régions posaient des problèmes récurrent lors de l'assemblage de génomes, que le séquençage Pacbio permet de les contourner en partie.

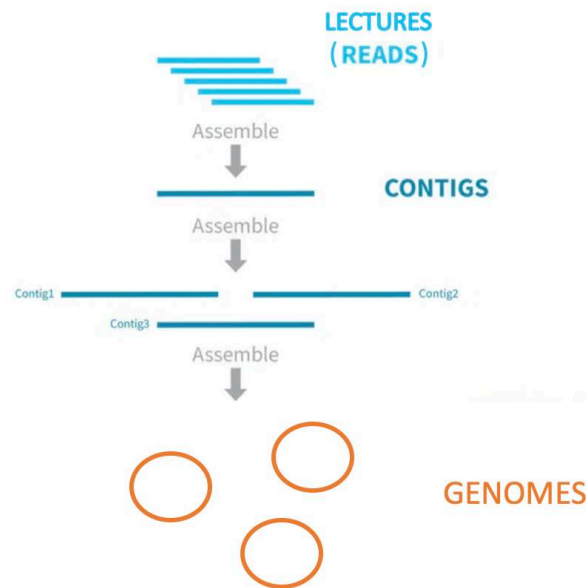
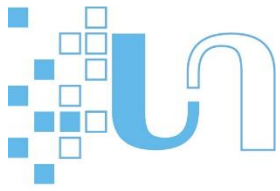


Figure III.12. Schéma récapitulant les étapes nécessaires à l'assemblage de génomes.

Schéma modifié à partir de <https://thesequencingcenter.com/knowledge-base/de-novo-assembly/>

III.5.3. Séquençage et assemblage

L'extraction de l'ADN a été effectuée à l'aide du kit DNeasy PowerSoil en suivant les instructions du fabricant (Laboratoires MO BIO, Royaume-Uni). Lorsque la concentration était en dessous de 20 ng/ μ L, plusieurs extractions ont été effectuées. Le séquençage a été réalisé sur un séquenceur Illumina NovaSeq 6000 sans amplification PCR préalable. De plus, 2 des 24 échantillons ont également été séquencés à l'aide du séquenceur Pacbio Sequel II 8M SMRT Cell Run (University of Maryland School of Medicine, USA). À cette fin, nous avons réalisé une extraction d'ADN spécifique en prenant soin de conserver au mieux l'intégrité de l'ADN. Pour cela à l'issue de l'extraction nous avons réalisé une électrophorèse capillaire sur un Bioanalyseur Agilent 2100. Les données issues du séquençage Pacbio long read, n'ont été utilisées que pour réaliser un meilleur assemblage de génomes. L'assemblage des métagénomes (i.e. échantillons) ont été réalisés de manière indépendante en utilisant IDBA-UD (Peng et al., 2012) avec les paramètres « mink, 60 ; maxk, 120 ; step, 10 » et l'option « --precorrection ». Un assemblage hybride entre les données Pacbio et Illumina pour les échantillons correspondant, a été effectué avec SPAdes (Antipov et al., 2016; Deng et al., 2013), avec l'option « --only-assembler ».



III.5.4. Analyse des séquences

Un sous-assemblage de 20 millions de lectures a été utilisé pour calculer le taux de GC de chaque échantillon à l'aide du programme GeeCee du progiciel EMBOSS (Rice, 2000). Ce même sous assemblage a été utilisé pour obtenir les gènes codants pour l'ARNr 16S de chaque métagénome en utilisant l'outil *ssu-align* (Nawrocki, 2009). Ensuite, BLASTN (Altschul et al., 1997) a été réalisé contre la base de données SILVA_138_SSURef_Nr99_Tax_silva publiée en décembre 2019 (Quast et al., 2012) afin d'obtenir la classification taxonomique.

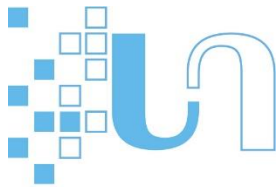
III.5.5. Assemblage des génomes et estimation de la qualité

Les génomes ont été obtenus en utilisant MetaBAT2 (Kang et al., 2019). En bref, les contigs de taille supérieur à 5kb (Illumina) et 10kb (PacBio) ont été indexés et alignés sur les séquences « lectures courtes » (short read). Ensuite, SAMtools a été utilisé pour trier les fichiers BAM et la profondeur de couverture des contigs a été calculée en utilisant MetaBAT2. La qualité de chaque génome a été évaluée avec CheckM v1.0.12 (options : lineage_wf) (Parks et al., 2015). Seuls les génomes ayant une complétude > 50% et une contamination moyenne < 5% ont été retenus pour une analyse plus approfondie. Pour identifier les redondances, le score moyen d'identité nucléotidique (ANI) a été calculé en utilisant un seuil $\geq 95\%$ et seuls les génomes non-redondants possédant une qualité plus élevée ou une complétude plus importante ont été conservés. La classification taxonomique des génomes ainsi que la reconstruction phylogénomique ont été effectuées en utilisant la GTDB-TK (Chaumeil et al., 2019).

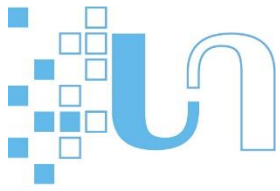
L'abondance des génomes dans les échantillons a été calculée en fonction du nombre de lecture (read) par kilobase de génome par gigabase de métagénome (RPKG). Les lectures brutes ont été alignées contre les génomes en utilisant BLASTN en appliquant un seuil d'identité de séquence de 95% sur une longueur d'alignement minimum de 50 nucléotides et une valeur $e \leq 1 \times 10^{-5}$.

III.5.6. Annotation des génomes

Afin d'établir une annotation robuste des protéines impliquées dans la dégradation des polysaccharides, l'annotation des gènes codant pour les CAZymes (Carbohydre-Active enZYmes) a été réalisée à l'aide de run_dbcan v2.0.11 (Zhang et al., 2018), utilisant HMMER (Eddy, 1998), DIAMOND (Buchfink et al., 2015) et Hotpep (Busk et al., 2017) contre dbcan, CAZY et la base de données PPR (Peptide Pattern Recognition) respectivement. Pour atteindre une précision minimale de 0,93%, seules les protéines identifiées similaires par au moins deux des outils mentionnés ci-dessus ont été conservées. Les protéines impliquées dans le cycle de l'azote et du soufre, le métabolisme du carbone et la fermentation ont été annotées en utilisant

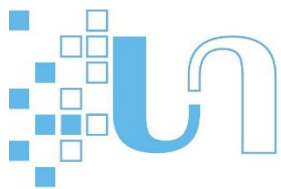


DIAMOND vo.9.14.115 contre une version non-redondante de la base de données KEGG (longueur d'alignement minimale de 30 acides aminés et une e-value = 1×10^{-5}). Les voies métaboliques ont été reconstruites à partir des gènes annotés via KEGG grâce à des outils personnalisés.



Partie n°4

Description à haute résolution de la diversité et de la fonctionnalité prédite des communautés microbiennes le long de profils de tourbe dans trois tourbières d'altitude des Pyrénées



Partie IV. Description à haute résolution de la diversité et de la fonctionnalité prédite des communautés microbiennes le long de profils de tourbe dans trois tourbières d'altitude des Pyrénées

Etienne Richy¹, Laure Gandois², Alice Baldy¹, Pilar Durantez Jimenez², Gaël Le Roux², Benjamin Komac³, François De Vleeschouwer², François Rigal¹, & Béatrice Lauga^{1,*}

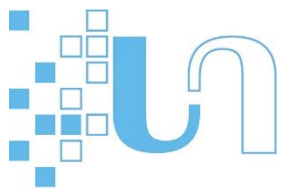
¹Université de Pau et des Pays de l'Adour, E2S UPPA, CNRS, IPREM, Pau, France

²Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement, UMR 5245, CNRS-UPS-INPT, Toulouse, France

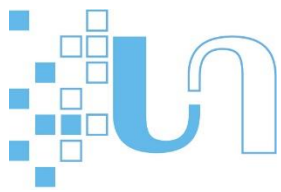
³Centre d'Estudis de la Neu i la Muntanya d'Andorra; Institut d'Estudis Andorrans (CENMA - IEA); Avinguda Rocafort 21–23, AD600 Sant Julià de Lòria, Principality of Andorra

Contexte de l'étude

Les tourbières jouent un rôle clé dans le cycle du carbone. Principalement localisées dans l'hémisphère nord (i.e. 80 % dans les zones boréales et subarctiques), ces tourbières stockent environ 550 Gt de carbone, et contribuent activement au stock de carbone (C) mondial (Yu et al., 2010). Les études qui ont été entreprises pour décrire les communautés microbiennes dans ces tourbières se sont principalement focalisées sur les tourbières les plus septentrionales, notamment en raison de la fonte spectaculaire du permafrost dans ces régions. Néanmoins, les tourbières localisées dans la limite sud de l'aire de répartition des tourbières du nord méritent elles aussi une plus grande attention. Bien qu'elles soient de tailles plus modestes et plus dispersées que les tourbières localisées en Russie (nord-ouest de la Sibérie), au Canada (basses terres de la baie d'Hudson-James) ou encore au États-Unis (Minnesota, Floride et Alaska), leur fréquence permettrait de stocker entre ~1 200 (Cooper *et al.*, 2012) et ~1 500 Mg C ha⁻¹ (Hribljan *et al.*, 2015), ce qui correspond au stockage moyen défini pour les tourbières boréales (Gorham, 1991). Ces écosystèmes constituent également un patrimoine naturel unique, relique des climats anciens et riche d'une biodiversité exceptionnelle menacée par le changement climatique et l'utilisation des espaces naturels. Dans les Pyrénées, les tourbières sont des éléments emblématiques du territoire et ont une très haute valeur patrimoniale. Renforcer la connaissance et la surveillance de ces écosystèmes naturels et uniques sont deux piliers essentiels pour mieux en comprendre le fonctionnement et, plus globalement, y évaluer l'impact du changement climatique.



À ce jour, peu d'études ont été menées sur les communautés microbiennes des tourbières de montagne. Ainsi, l'objectif de ce premier chapitre a été d'étudier les communautés microbiennes de ces écosystèmes. Des échantillons ont été collectés dans trois tourbières pyrénéennes (deux tourbières andorranes et une tourbière espagnole), toutes localisées à une altitude supérieure à 2000 m. Nous avons effectué une analyse en haute-résolution par l'examen de la diversité microbienne taxonomique et phylogénétique quantifiée tous les 4 cm en moyenne sur l'intégralité du profil de profondeur de chaque tourbière (de 36 à 92 cm). Le potentiel fonctionnel des communautés microbiennes a été prédit à l'aide de l'outil PICRUSt. Ce logiciel utilise un arbre phylogénétique de référence pour déduire les capacités métaboliques des séquences d'ARNr 16S à partir de l'ancêtre le plus proche. Afin d'analyser l'influence des paramètres environnementaux sur la structure des communautés microbiennes, les valeurs de pH, le rapport C/N, la densité apparente et la teneur en eau ont été également mesurés.



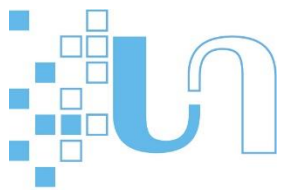
High-resolution of microbial diversity and predicted functionality along peat profiles of three mountainous remote Pyrenean peatlands

(In prep)

IV.1. INTRODUCTION

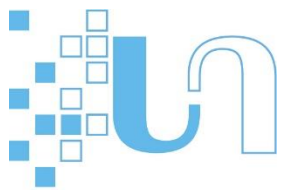
Climate change poses serious threats to many of the world's ecosystems. Among these, peatlands are of particular concern. Peatlands are wetland ecosystems, frequently or permanently waterlogged. The specific environmental conditions prevailing in these wetlands, among which, hydrology, groundwater chemistry, climate, create conditions in which plant primary productivity exceeds microbial decomposition leading to the accumulation of peat (Clymo, 1984). As a result, peatlands have built up an impressive carbon (C) stock over the past few millennia, with the most recent estimates for northern peatlands, ranging from 500 Gt (Yu *et al.*, 2010) to 1,105 Gt (Yu *et al.*, 2010, Nichols & Peteet, 2019). This makes peatlands one of the largest carbon pool on Earth although they occupy only about 3% of the landmass (Maltby & Immerzi, 1993).

Despite being a long-term persistent C sink, peatlands contribute to CO₂ exchange with the atmosphere and, as well, to atmospheric CH₄ emissions, which they are one the largest natural source (Yu *et al.*, 2010). Whereas strength of both processes has varied over time since the Last Glacial Maximum, their intensity in response to ongoing warming is still uncertain and of concern (Gallego-Sala *et al.*, 2018). Among the scenarios, it has been suggested that peatlands will remain a carbon sink in the future but they might shift from a negative to a positive climate feedback mechanism at the end of the twenty-first century (Yu *et al.*, 2011). The fate of the carbon stock buried in peatlands hangs on the activity of microorganisms that thrive in the peat. Under the influence of climatic change and its indirect incidence on hydrological regime, it has been hypothesized that if dryer conditions prevailed, the drawdown of the water table, will enhance peat aeration, enhancing therefore the decomposition of organic matter by the heterotrophic microbial communities and in consequence, favoring the release CO₂ to the atmosphere (Moore & Knowles, 1989, Gorham, 1991). In contrast, in the same time, CH₄ emission resulting from the activity of methanogenic archaea in prevailing anoxic and water-saturated conditions in buried deeper peat layers would decrease as a results of the activity of methanotrophs, in the upper peat layers i.e. in oxic conditions (Moore & Knowles, 1989). Therefore, shift from oxic to anoxic condition, including at the oxic-anoxic interface will



also greatly affect the composition of the microbial community along the peat column and the overall ecophysiological processes. Several studies already described the microbial structure in peatlands though most of them focused either on the peat surface or near surface (e.g. Deng *et al.*, 2014, Tian *et al.*, 2019), or included few samples throughout the depth gradient irrespective of peat depth (e.g. Preston *et al.*, 2012, Tsitko *et al.*, 2014, Asemaninejad *et al.*, 2017, Zhong *et al.*, 2017, Asemaninejad *et al.*, 2019, Wang *et al.*, 2019) or considered homogenized sections along the peat profile (Lin *et al.*, 2014, Lin *et al.*, 2014) while thorough examination of the microbial composition along the depth gradient all over the entire peat profile is lacking. The change in microbial community structure along the depth gradients also involves a change in the metabolic activity of microorganisms. Thus, the catotelm, the anoxic, water-logged, permanently saturated and lower compacted layer is considered as the less microbiologically active zone compared to the acrotelm, the upper predominantly oxic layer that received plant material and where organic matter decay takes place (Charman, 2009). According to Clymo's peat model formation (Clymo, 1984), plant material decomposition in this layer is fast and govern by a large populations of aerobic microorganisms. The acrotelm is mostly affected by the fluctuating groundwater table and subjected to oxic-anoxic fluctuations. To distinguish predominantly oxic zone from predominantly anoxic zone, Clymo & Bryant (2008) proposed an additional layer to the two ordinal layers established by Ingram (1978), the mesotelm, located at the mean depth of the minimum water table in summer and fluctuates around this position.

Because of their contribution to global carbon pool, Northern peatlands that occur mostly in boreal and subarctic regions and account for about 91% of the world's surface peatland area (Yu *et al.*, 2010), have been the focus of much attention. Peatlands, nevertheless, covers a large diversity of milieu among which fens, bogs and permafrost peatland are encountered in other regions in the world (2017, Leifeld & Menichetti, 2018). In many mountainous regions (>1,000 m.a.s.l.), peatlands have been form as a result of mountainous' high-altitude water storages since (~15,000 years BP) the last ice age (Dodson, 1987, Squeo *et al.*, 2006, Chimner *et al.*, 2010, Dudová *et al.*, 2013, Chen *et al.*, 2014, Cubizolle & Thébaud, 2014). Although patchy and of modest size compared to vast Northern peatlands, they can store between ~1,200 (Cooper *et al.*, 2012) and ~1,500 Mg C ha⁻¹ (Hribljan *et al.*, 2015), which concurs with the average storage of 1,330 Mg C ha⁻¹ defined for boreal peatlands (Gorham, 1991). In addition, high-elevation peatlands are also of interest because they are subject to large daily and seasonal temperature variations that may reflect short-term climatic pressure on Northern peatlands (Seward *et al.*, 2020). Thus, because they contribute to the regional and global carbon cycle, remote mountainous peatlands deserve further attention to better strengthen scientific understanding of peatland carbon dynamic and to serve as reference to assess the likely future trajectories of Northern Hemisphere peatlands in response to future warming (Yu, et al., 2011). Moreover, and despite growing interests on the role of microorganisms in the



functioning of Northern peatlands because of their pivotal role in key biogeochemical processes in these ecosystems (e.g. Andersen *et al.*, 2013, Ivanova *et al.*, 2016, Juan-Ovejero *et al.*, 2020), we still need to deepen our knowledge on the composition of their microbial communities, the relationship between microbial community structure and functioning, and the drivers that govern their assembly. In mountainous peatlands, microbial diversity patterns may be imprinted by the singularity of inherent high-altitude facies (e.g. patchiness, modest sizes) and the harsh climatic conditions, important seasonal temperature fluctuations, elevated moisture and high precipitations, partly in the form of snow, as already noticed in other environments for macroscopic taxa (McCain, 2005, McCain, 2007) or microorganisms (but see Fierer *et al.*, 2011, Tang *et al.*, 2020). To date, however, the characterization of mountain peat microbiome is at its infancy (Tian *et al.*, 2019, Seward *et al.*, 2020) and the influence of mountains specific factors has still to be demonstrated.

The purpose of this study was to assess the diversity patterns of prokaryotic microorganisms inhabiting three remote mountain peatlands, located at an altitude of over 2000 m and below the southernmost extreme of the Northern peatland distribution, namely below latitude 45°N (Yu *et al.*, 2011), in the Pyrenees. More specifically, we investigated how species, phylum and phylogenetic diversity and composition of each peatland vary over the peat profile by performing a fine resolution sampling along the collected cores. In addition, we quantified the role of potential factors such as bulk density and C:N ratio in explaining diversity patterns along the depth gradient and tested the relative importance of geographical location and depth in determining the species, phylum, phylogenetic and functional composition of these remote peatland microbial communities.

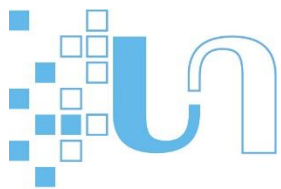
IV.2. MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

All necessary permits required for the sampling collection were obtained to collect peat cores in the National parks of Aigüestortes (Spain) and of vall de Sorteny (Principality of Andorra), complying with all relevant regulations.

Study sites and sampling

Our study was conducted in the eastern Pyrenees in three distinct small high-altitude peatlands: the peatlands Encenrera and Clots de l'Estany (Principality of Andorra) located at 2145 and 2575 m asl, respectively and the peatland Cap de la Ribereta in the national park of Aigüestortes (Catalogna, Spain) located at 2280 m asl (**Figure IV.1**). Sampling was carried out the 19, 20 and 28th of September in 2017,



respectively. Coring was performed with a box-type peat corer (1 m x 10 cm x 10 cm). Two cores were collected in Aigüestortes, one in a sphagnum hummock (hereafter AYG₁) and one in a sphagnum lawn near a small stream (AYG₂). One core was collected in Encenrera peatland in a herbaceous lawn (ENC) while two cores were collected in the peatland Clots de l'Estany (CEST₁, CEST₂) in sphagnum hummocks. Temperature profiles were recorded near the coring sites every 5 cm using a probe connected to a hand-held digital thermometer. The lengths of the cores corresponded to the depth of the peat: 92 cm for ENC, 68 and 41 for CEST₁ and CEST₂ and 60 and 36 cm for AYG₁ and AYG₂. At each site, water table level was measured around one hour after coring. Conductivity, dissolved oxygen (DO), temperature and pH of the pore water samples of AYG₁, CEST and ENC were measured in field using WTW probes (ConOX and Sentix 40) and a sample of porewater was collected for further geochemical analyses. Pore water samples were filtered using 0.22 µm cellulose acetate filters GSWPo4700, (Merck-Millipore, USA) and DOC concentration was analyzed in filtered samples after acidification to pH 2 with a TOC-5000A analyzer (Shimadzu, Japan). Peat cores were frozen at -20°C and subsequently sectioned into increments of 1 cm approximately. For each section, three subsamples were collected and stored in plastic bag for further microbiological and geochemical characterization (De Vleeschouwer et al., 2010). The subsamples were immediately frozen at -20°C. Subsamples were pooled every 2 cm from the 0 to 10 cm, and every 5 cm from 10 cm to the bottom of the core. This represents 12, 16 and 21 samples for the largest cores (i.e. AYG₁, CEST₁ and ENC, respectively), 9 and 10 for the shorter cores (i.e. AYG₂ and CEST₂, respectively). One pooled subsample was weighted (wet weight) and subsequently dried in the oven at 60°C for 48 h to obtain the dry weight. Bulk density was determined by dividing the dry weight by the volume of the subsample and water content was calculated as the wet weight minus dry weight divided by wet weight. Another pooled subsample was used to determine the total organic carbon and nitrogen and C:N mass ratio using a FLASH 2000 ThermoFisher™ elemental analyzer.

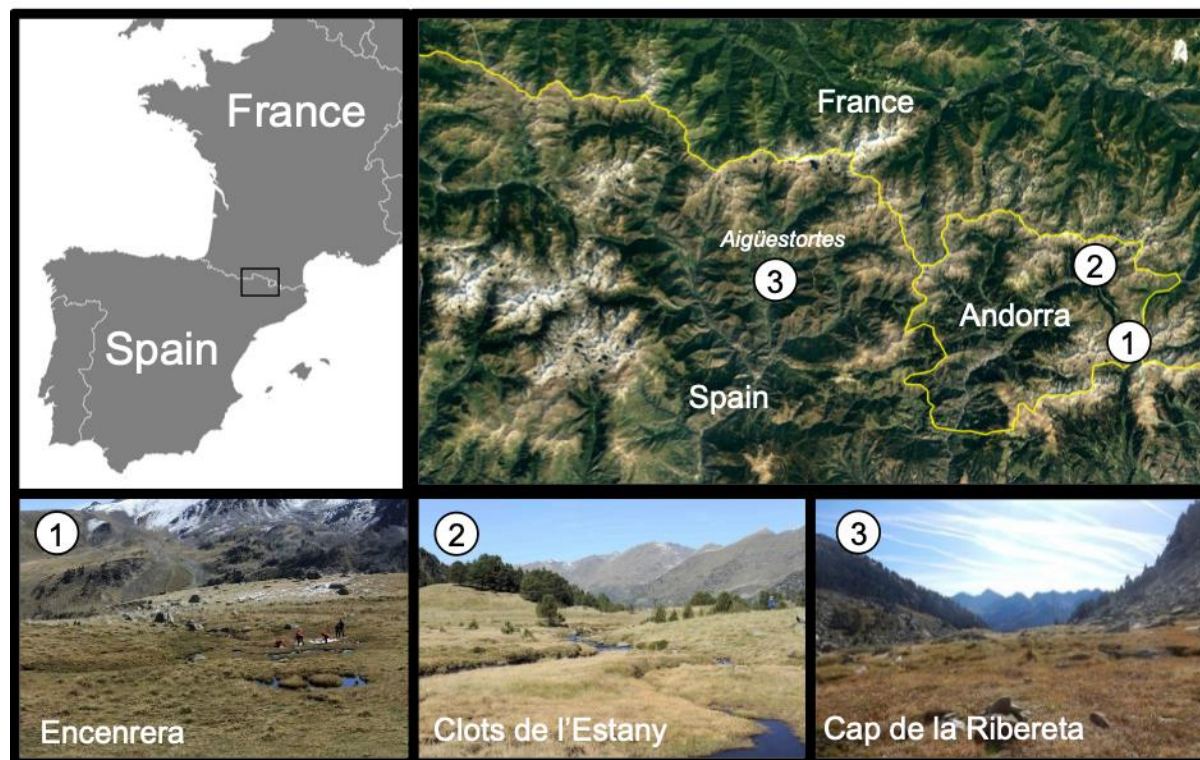
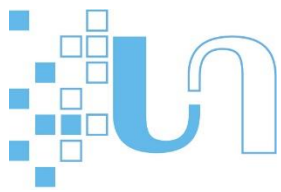


Figure IV.1. Location of the three peatlands sampled in the study.

DNA extraction, PCR amplification and sequencing

Frozen pooled subsamples for the microbiology were then homogenized and crushed in porcelain bowls under liquid nitrogen. DNA was extracted using the PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories) according to the manufacturer's recommendations. The 16S library was constructed according to Lluh *et al.* (2015). A 413 bp fragment targeting the hypervariable V3-V4 region from bacterial 16S rRNA gene was amplified with 515F (5'- GTGYCAGCMGCCGCGGTA-3') and 928R (5'- CCCCGYCAATTCMTTTRAGT-3') primers and with the following amplification conditions: 95°C for 10 min, followed by 35 cycles of 95°C for 45 s, 54°C for 45 s and 72°C for 1 min, after which a final elongation step at 10°C for 10 min was performed. Sequencing was performed on a Illumina MiSeq Desktop Sequencer (Illumina Inc., CA, US) using paired-end sequencing with MiSeq Reagent Kits v3 (Illumina Inc., CA, US) on the Genotoul platform (Auzerville, France).



Sequence processing, taxonomic classification and phylogenetic tree

The open source software QIIME 2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) was used for sequence read analysis of the bacterial and archaeal 16S rRNA gene sequence (Bolyen *et al.*, 2019). Bacterial and archaeal primer-specific trained Naive Bayes taxonomic classifiers², using the SILVA 132 release, were used to classify the representative amplicon sequence variants (ASV) sequences. ASV sequences were used to build a phylogenetic ASV trees using the QIIME 2 phylogeny "align-to-tree-mafft-fasttree" plugin. A chronogram was further generated from the phylogenetic tree using the 'chronos' function (default setting) provided in the R package ape (Paradis *et al.*, 2004). This function provides a ultrametric tree dated in relative time (i.e. root at 1 and tips at 0) which was used for subsequent analyses of phylogenetic diversity. To account for variable sequencing depth, all the following diversity metrics detailed below were calculated using a rarefied matrix subsampled to 6688 reads per sample representing 327712 ASV over the three peatlands.

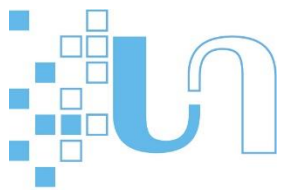
Functional Predictions

Functional composition of the samples were predicted using the Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (PICRUSt 2.3.0) (Douglas *et al.*, 2020). PICRUSt2 consists, first, of aligning ASVs to reference sequences using HMMER (<http://www.hmmerr.org/>) and placing ASVs in a phylogenetic reference tree using Evolutionary Placement-ng (EPA-ng) Algorithm and Genesis Applications for Phylogenetic Placement Analyses (GAPPA) (Barbera *et al.*, 2019, Czech *et al.*, 2020). Prediction and abundance of gene families per sample was run using the R package castor (Louca & Doebeli, 2018) and pathway abundances were inferred using MinPath (Ye & Doak, 2009). MetaCyc pathways abundance of peatland metagenomes were further inferred from E.C. number abundance predicted using default parameters.

Statistical analyses

All the following statistical analyses were implemented within the R programming environment (R Development Core, 2018).

We test whether ASV, phylum and phylogenetic diversity (alpha diversity) and compositions (beta diversity) varies along the depth gradient for each core separately. The exponential of Shannon (e^H) was selected as our metric for alpha diversity (Haegeman *et al.*, 2013). Correlation between depth and e^H was tested using Pearson's correlation. Beta diversity between all pairs of samples were quantified using Jaccard dissimilarity index for ASV and phylum and UniFrac for phylogenetic beta (β) diversity for each

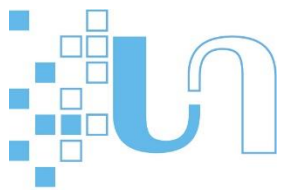


core separately. UniFrac is similar to the Jaccard index except that it incorporates branch lengths in the computation of β diversity (Lozupone & Knight, 2005). Following Cardoso et al. (2015), we further partitioned Jaccard and UniFrac indices into their replacement (β_{repl}) and richness difference (β_{rich}) components as the overall $\beta_{\text{total}} = \beta_{\text{repl}} + \beta_{\text{rich}}$ and only the component β_{repl} was further analyzed as our beta measures because it quantifies the true turnover of ASV/phylum/branches between samples without the influence of differences in richness (i.e. alpha diversity). We plotted beta diversity between pairs of consecutive samples with depth to detect potential shift in ASV, phylum and phylogenetic composition along the depth gradient. Furthermore, we tested whether beta diversity in ASV, phylum and phylogenetic composition decay with increasing distance between pairs of samples were analyzed using Mantel permutation test with Pearson's correlation, based on 9,999 permutations.

Relationships between bulk density, water content, total carbon (C), nitrogen (N) and C:N on alpha and beta diversity of each peat core were tested using partial correlations and partial Mantel tests respectively. These two tests produce a correlation coefficient for two variables while controlling for a third one (herein depth) (Smouse *et al.*, 1986). Partial correlation procedures were necessary to avoid a confounding effect of depth in the correlations with environmental variables because all these variables were somehow correlated with depth. For beta diversity all predictors were transformed into distance matrices.

We tested for the relative importance of geographical location (i.e. peatland identity) and depth in explaining ASV, phylum, phylogenetic and functional (pathways) composition among the three peat cores by using non-parametric permutational multivariate analysis of variance (PerMANOVA) (Anderson, 2001) with peatlands, depth and their interaction as factors. Functional dissimilarity between samples was computed with the Bray-Curtis distance. PerMANOVAs were performed using permutation tests with 9999 iterations. Differences in ASV, phylum, phylogenetic and functional composition between peatlands were visualized using non-metric multidimensional scaling ordinations (NMDS).

Lastly, we used indicator species analysis (Cáceres & Legendre, 2009) to test whether the metabolic pathways inferred from PICRUST were preferentially associated to specific combinations of depth and/or peatlands. Since an indicator species analysis can only be implemented with samples grouped into categories, we used the water table level to transform the depth gradient into a two-level factor with samples classified as above or below the water table. We thus assumed that this classification should roughly distinguish between samples mainly under oxic conditions and those under anoxic conditions. Thus, we obtained 9 samples above and 3 below for AYG1, 9 and 7 for CEST1 and 4 and 17 for ENC. We then computed the association of the pathways to all possible combinations of the three peatlands and the factor above/below (i.e. 6 combinations) and a permutation test ($N = 9999$) was used to determine whether particular pathways were significantly associated with a given condition or group of conditions under the null hypothesis of no association. All p-values were FDR (False Discovery Rate) corrected.



IV.3. RESULTS

Due to their small sample size and the absence of the water table, both AYG₂ and CEST₂ were omitted from the analyses performed in this section. A brief summary of their main characteristics is given in Appendix S₁, **Figure IV.7** and **Figure IV.8** for information.

Table IV-1. Geographical and biogeochemical characteristic of the three peat cores analyses in our study.

*Note that a second core was collected for the peatland Aigüestortes and Clots de l'Estany (AYG₂ and CEST₂ respectively) but were not represented in the present study due their small sample size and absence of water table. A brief summary of their main characteristics is given in Appendix S₁, **Figure IV.7** and **Figure IV.8**.*

	Aigüestortes	Clots de l'Estany	Encenrera
Abbreviation	AYG ₁	CEST ₁	ENC
Geographical coordinates	42°34'50"S 0°55'30"W	42°36'45"S 1°34'26"W	42°31'50"S 1°41'11"W
Altitude (m)	2280	2145	2343
Sampling site	Hummock	Hummock	Lawn
Maximum depth (cm)	48.8	67.5	90
Number of samples	12	16	21
Water table (cm)	-38.8	-57.5	-10
Pore water characteristics			
Conductivity (μS)	50.5	83.8	75.4
pH	5.7	5.9	6.2
Temperature (°C)	7.8	9	7.8
Dissolved oxygen (mg)	0.31	0.04	0.97
Dissolved organic matter (mg/L)	4.4	28	12.7
Alkalinity (mg HCO ₃ ⁻ /L)	9.2	-	35.6

Porewater and peat characteristics

At the time of sampling, the water table depth differed greatly between the peatlands with values of and, 38.8, 57.5 and 10 cm below the surface for AYG1, CEST1 and ENC, respectively (**Table IV-1**). Dissolved Organic Carbon (DOC) was higher in CEST than in ENC and AYG1. Accordingly, the conductivity and alkalinity were higher in CEST1 than in ENC and AYG1. The temperature was slightly higher in CEST1 than in ENC and AYG1 while pH was relatively constant between peatlands. Dissolved oxygen was very low for all peat cores i.e. <1.

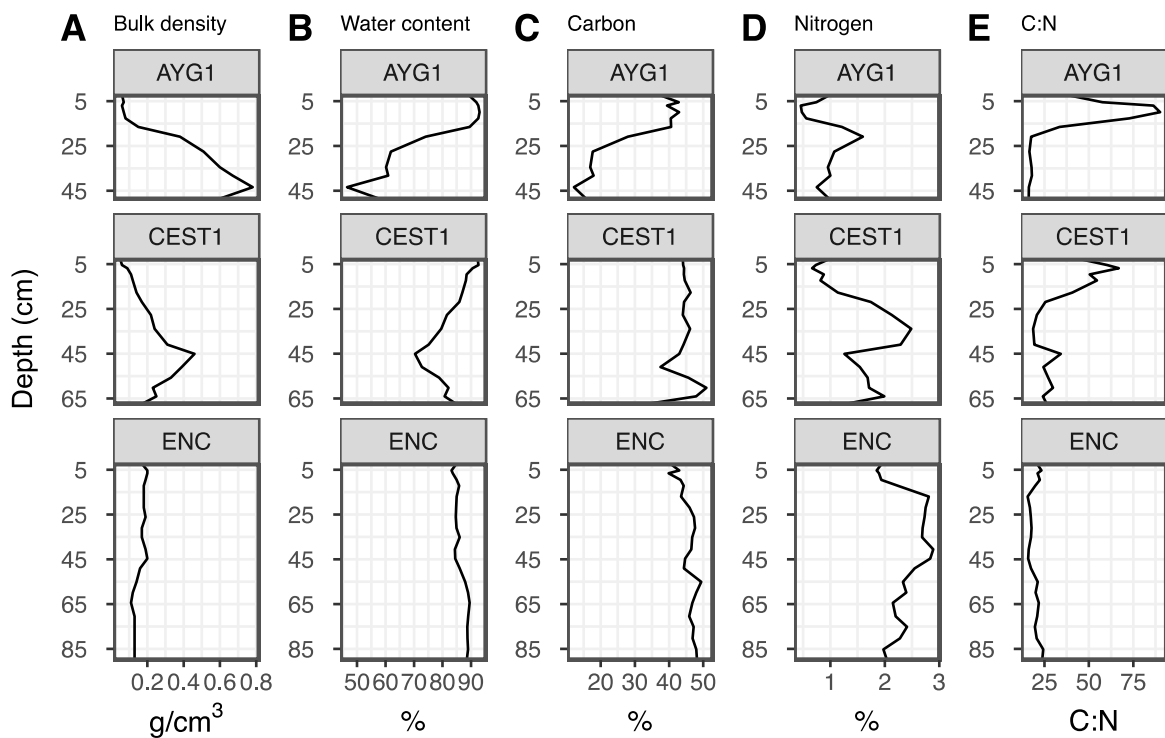
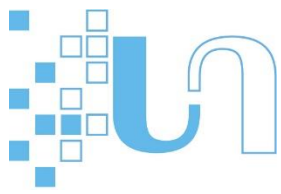


Figure IV.2 Physical and chemical characterization for the three sampled peatlands.

Each profile is based on an analysis at fine resolution of each peat core from the surface to the maximum depth of each core. AYG1= Aigüestortes; CEST1 = Clots de l'Estany and ENC = Encenrera.

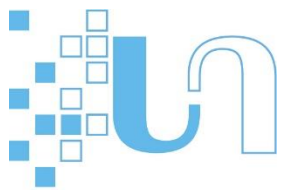
For AYG1, bulk density greatly varied along the depth gradient (0.34 ± 0.28 g/cm³) and showed a marked increase with depth for AYG1 ($r = 0.94$; $P < 0.001$) shifting from 0.06 near the surface to 0.78 g/cm³ at 43 cm



below the surface (**Figure IV.2A**). Bulk density was on average lower in CEST₁ (0.21 ± 0.11 g/cm³) and increased with depth ($r = 0.69$; $P=0.002$), reaching a maximum at two-third of the gradient (0.46 g/cm³ at 45 cm). For ENC, bulk density was on average lower and showed less variation (0.16 ± 0.03 g/cm³) than the other two peat cores and decreased significantly with depth ($r = -0.83$; $P < 0.001$). For AYG₁, water content was negatively correlated with depth ($r = -0.93$; $P < 0.001$) dropping from 92% at the surface to a minimum of 46% near the bottom. For CEST₁, water content was also negatively correlated with depth ($r = -0.69$; $P=0.002$) being > 90% in the upper layers and reaching a minimum of 70% at two-third of the gradient. In contrast, water content in ENC was positively correlated with depth ($r = 0.87$; $P < 0.001$) but showed little variation along the gradient ranging from 83% near the surface to about 88-89% in the deepest layers. Percentage of carbon (C) exhibited stronger variations in AYG₁ than in CEST and ENC with values ranging from 12.15 to 42.95%, from 33.53 to 50.91% and from 39.89 to 49.43%, respectively (**Figure IV.2B**). Moreover, C was negatively correlated with depth for AYG₁ ($r = -0.92$; $P < 0.001$) with a sharp decrease approximately at -25 cm. In contrast C was not correlated with depth for CEST ($r = 0.16$, $P=0.55$) while a positive correlation was detected for ENC ($r = 0.72$; $P < 0.001$). Percentage of nitrogen (N) varied from 0.46 to 1.60, 0.66 to 2.49 and 1.85 to 2.89% for AYG₁, CEST₁ and ENC respectively and did not display any significant correlation with depth, except marginally for CEST ($r = 0.55$; $P=0.024$) (**Figure IV.2C**). The magnitude of C:N variation greatly differ between cores with values ranging from 16.08 to 90.10, from 18.56 to 66.8 and from 15.49 to 24.27 for AYG₁, CEST₁ and ENC, respectively (**Figure IV.2D**). The C:N ratio was negatively correlated with depth for AYG₁ and CEST₁ ($r = -0.73$; $P=0.007$ and $r = -0.72$, $P=0.002$, respectively), reaching its maximum in the first 10 cm for both peat cores while for ENC, C:N did not exhibit any significant relationship with depth ($r=0.28$, $P=0.22$).

Patterns of ASV, phylum and phylogenetic diversity and composition along the depth gradient

Altogether, we detected 59 distinct phylum-level lineages in the three peatlands investigated. A high proportion of ASV remained unassigned at the order (around 23%) and family level (around 45%). Changes in relative abundance of the predominant microbial groups (i.e. phyla excepted for Proteobacteria for which Alpha-Gamma-Delta-proteobacteria were analyzed separately) along the depth gradient displayed similar patterns between the three cores (**Figure IV.3A**). Overall, one main shift in composition was detected in all cores roughly at 170, 250 and 100 mm for AYG₁, CEST₁ and ENC respectively with, in the upper layers the dominance of Acidobacteria, Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria and Actinobacteria, while Chloroflexi, Bacteroidetes, Deltaproteobacteria were prevalent in the lower layers. The shift between the two zones was clearly marked by the appearance of Archaea (predominantly



Crenarchaeota but also Euryarchaeota). Additional analysis testing the Pearson's correlation between the relative abundance of the main microbial groups and depth highlighted the strong decrease of Acidobacteria, Alphaproteobacteria and Gammaproteobacteria, Actinobacteria and Planctomycetes along the depth gradient for the three peat cores (

Figure IV.9 and **Table IV-3**) except for Acidobacteria in AYG₁ and Planctomycetes in ENC for which no significant relationship was reported. An opposite trend was observed for the Chloroflexi, Nitrospirae, Crenarchaeota, Spirochaetes for the three peat cores (

Figure IV.9 and **Table IV-3**) while a significant increase was found for the Deltaproteobacteria and Euryarchaeota only in AYG₁ and CEST₁, for Bacteroidetes and Firmicutes in AYG₁ and for Nanoarchaeaeota in CEST₁ and ENC. ASV-based e^H showed no significant correlation with depth for AYG₁ ($r=-0.55$, $P=0.06$) but instead reached a maximum at 13 cm below the surface followed by a sharp decrease approximately between 25 and 35 cm (**Figure IV.3B**). In contrast, ASV-based e^H showed significant and negative relationship with depth for both CEST₁ and ENC ($r=-0.80$, $P<0.001$ and $r=-0.67$, $P<0.001$, respectively) while phylogenetic and phylum-based e^H were found to significantly and positively correlated with depth for the three peat cores (all $r < 0.65$, all $P < 0.02$).

A shift in composition was also detected with the phylum-based beta diversity calculated between consecutive pairs of samples (**Figure IV.3C**) with the highest turn-over detected between 34.5 and 38.2 cm for AYG₁, between 33.9 and 41 cm for CEST₁ and between 95 and 121.3 cm for ENC. A similar pattern was obtained for phylogenetic and ASV-based beta diversity in CEST₁ while the results for AYG₁ and ENC did not exhibit any specific pattern. Overall, all the Mantel tests showed a positive and significant relationship between ASV, phylum and phylogenetic-based beta diversity and distance in depth for all three cores (all $r > 0.35$, all $P < 0.01$) indicating substantial turnover in microbial community composition along the depth gradient.

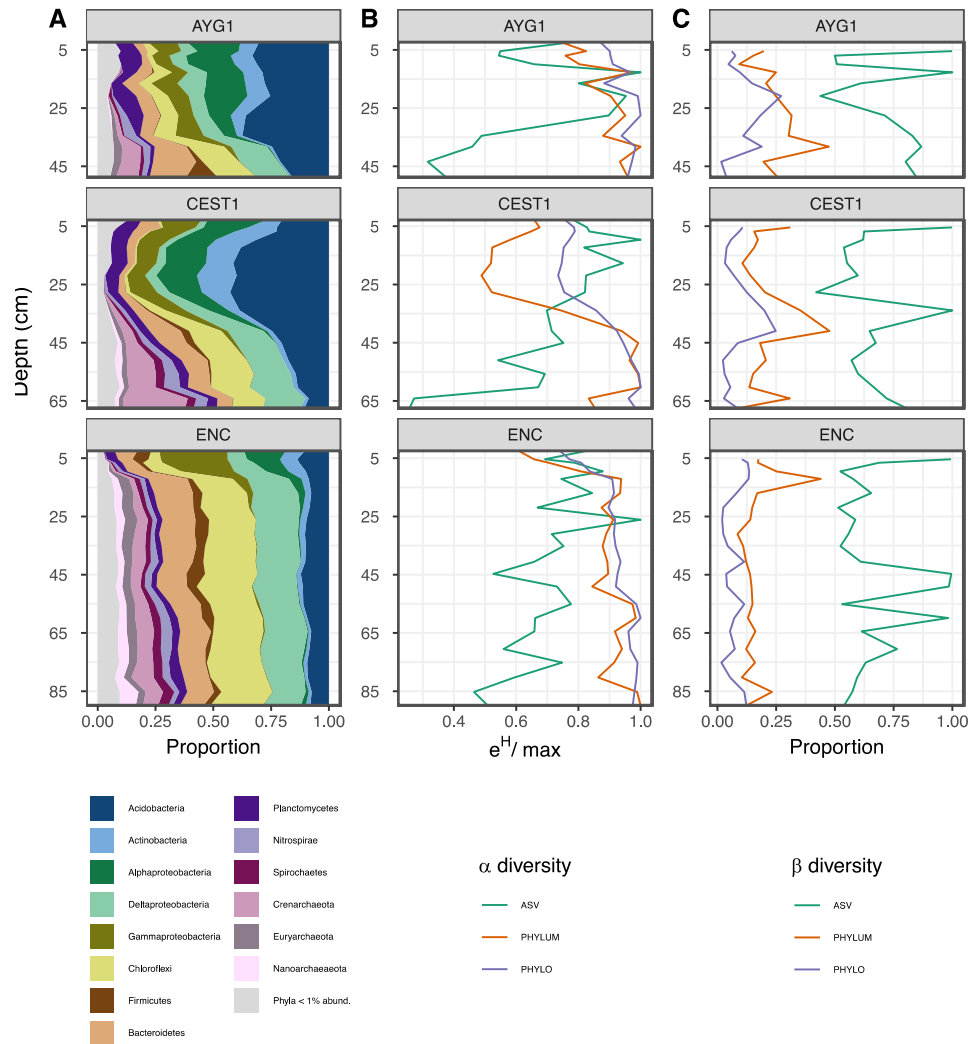
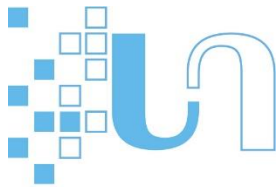


Figure IV.3. DNA-derived microbial community composition and diversity across the depth gradient in the three sampled peatlands.

(A) stacked plots of the relative abundance of major phyla (classes for Proteobacteria) (B) variation in alpha diversity (calculated with the exponential of Shannon, e^H') for ASV, phylum and phylogenetic diversity and (C) changes in beta diversity (calculated with the index β_{repl}) between pairs of consecutive samples for ASV, phylum (classes for Proteobacteria) and phylogenetic diversity. To visualize the variations of three e^H' in the same plot, values of e^H' were standardized by the maximum value so that e^H' is constrained between 0 and

1. AYG₁= Aigüestortes; CEST₁ = Clots de l'Estany and ENC = Encenera.



Correlations between environmental variables and ASV, phylum and phylogenetic diversity and composition along the depth gradient.

Few significant correlations were detected between bulk density, C, N, C:N and alpha diversity (**Figure IV.4A**). For CEST₁, bulk density and C:N were found to be positively correlated with ASV and phylogenetic alpha diversity, respectively. For ENC, C and N were positively correlated to both phylogenetic and phylum alpha diversity while C:N exhibited a positive correlation with phylogenetic alpha diversity only (**Figure IV.4A**). No significant relationship was detected for AYG₁. In contrast, multiple significant correlations between pairwise differences in environmental variables and beta diversity were reported (**Figure IV.4B**). For all cores, variations in C, N and C:N values were positively correlated with at least one beta diversity measure and C and N being positively correlated with all beta diversity for ENC. Interestingly, differences in bulk density and water content exhibited also positive and negative correlation respectively with all beta diversity for CEST₁ and for phylogenetic beta diversity only in AYG₁.

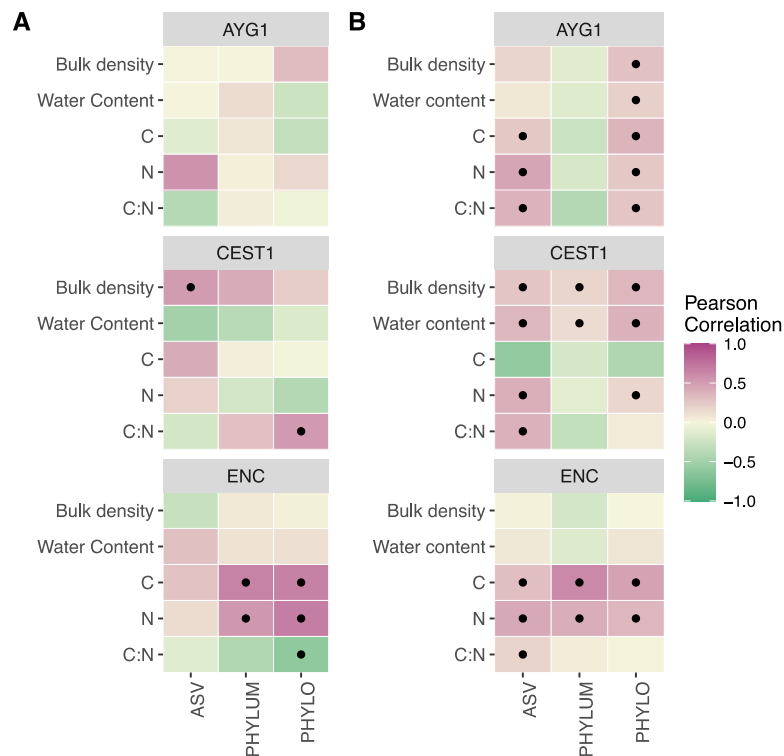


Figure IV.4. Correlations between environmental variables and alpha (A) and beta (B) diversity after accounting for the effect of depth.

For beta diversity, all variables were transformed to distance matrices. Green tones indicate a negative correlation; pink tones indicated a positive correlation. Black dots mark values that have statistically significant correlation (p -values < 0.05). AYG1 = Aigüestortes; CEST1 = Clots de l'Estany and ENC = Encenrera.

Relative importance of the geographical locations and depth in ASV, phylum, phylogenetic and functional composition.

PerMANOVA revealed that ASV beta diversity across all pairs of samples were significantly explained by geographical locations ($R^2=14\%$, See *Table IV-2* and **Figure IV.5A**) and, to a lesser extent, by the depth gradient ($R^2=8\%$). Conversely, for phylum-based beta diversity, the depth gradient was found to be more important than geographical locations ($R^2=19.5\%$ and $R^2=22.3\%$, respectively, **Table IV-2** and **Figure IV.5B**). This pattern was even more pronounced for phylogenetic and functional-based beta diversity with depth explaining almost twice as much variance as peatland identity (depth: $R^2=39\%$ and $R^2=48.8\%$ respectively, geographical locations: $R^2=25\%$ and $R^2=19\%$ respectively, **Table IV-2** and **Figure IV.5C-D**). In all PerMANOVA, a significant interaction was also detected (**Table IV-2**) highlighting a differential effect of depth on beta diversity among peatlands.

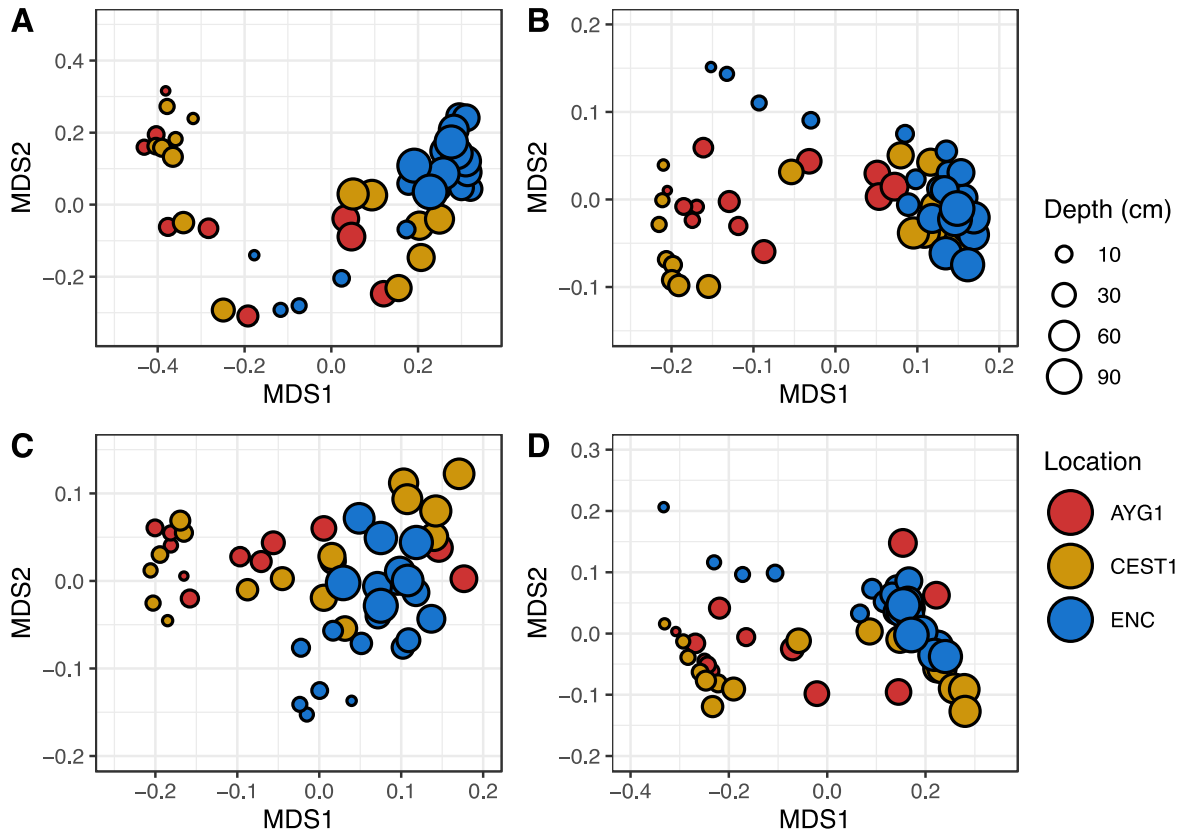
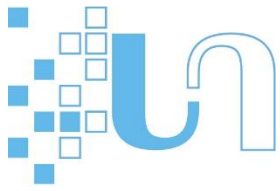


Figure IV.5. Two-dimensional ordination solution using non-metric multidimensional scaling (NMDS) based on the dissimilarity in ASV (A), phylum (B), phylogenetic (C) and functional (D) composition between all pairs of samples across the three peat cores.

Stress values of the NMDS were all < 0.13. AYG1= Aigüestortes; CEST1 = Clots de l'Estany and ENC = Encenrera.

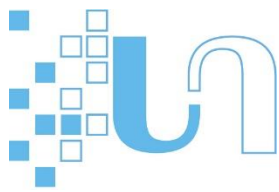
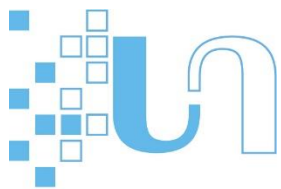


Table IV-2. Results of the PerMANOVA testing the effect of geographical locations, depth and their interaction in explaining ASV, phylum, phylogenetic and functional (pathways) composition among the three peat cores.

Degrees of freedom (df), F- statistics (F), R² and associated p-values (P) are shown.

Diversity	Effect	df	F	R ²	P
ASV	Geographical locations	2	4.604	0.141	<0.001
	Depth	1	5.215	0.080	<0.001
	Interaction	2	3.933	0.121	<0.001
Phylum	Geographical locations	2	10.804	0.195	<0.001
	Depth	1	24.766	0.223	<0.001
	Interaction	2	10.769	0.194	<0.001
Phylogenetic	Geographical locations	2	22.196	0.252	<0.001
	Depth	1	68.798	0.390	<0.001
	Interaction	2	10.099	0.115	<0.001
Functional	Geographical locations	2	20.301	0.198	<0.001
	Depth	1	99.983	0.488	<0.001
	Interaction	2	10.700	0.104	0.002



Association of inferred functional pathways with position from the water table and the geographical locations

A total of 388 on 428 inferred pathways was found to be significantly associated to at least one condition. In order to simplify the overall interpretation of this output, we chose to focus on 29 microbial pathways of interest in peatland functioning (**Figure IV.6**). Among these 29 pathways, about 20 were significantly associated to the samples located above the water table for at least one the three peat cores with among them, the hydrolysis of polysaccharides into simple monomers (e.g. galactose, D-fructuronate, D-glucuronide, xylose), the metabolism of carbohydrate metabolism (e.g. glycolysis, TCA cycle, gluconeogenesis), pathways associated to the nitrogen cycle (i.e. nitrate reduction, denitrification) and a large fraction of pathways involved in different fermentation processes (e.g. mixed acid, homolactic fermentation, pyruvate to propanoate fermentation). Metabolisms associated with samples located below the water table were mainly grouped into those related to one carbon metabolisms (e.g. acetoclastic and hydrogenotrophic methanogenesis, formaldehyde oxidation), acetogenesis (i.e. reductive acetyl coenzyme A) and a few others related to fermentation (i.e. pyruvate fermentation to butanoate, acetate and lactate). While the functional profile was relatively similar in CEST₁ and AYG₁, ENC appears to have different functional potential. In ENC, xylose and glucose were the main sources of organic matter, supporting mixed acid, homolactic and heterolactic fermentation. In addition, high abundance of nitrate reduction and denitrification were also revealed (**Figure IV.6**).

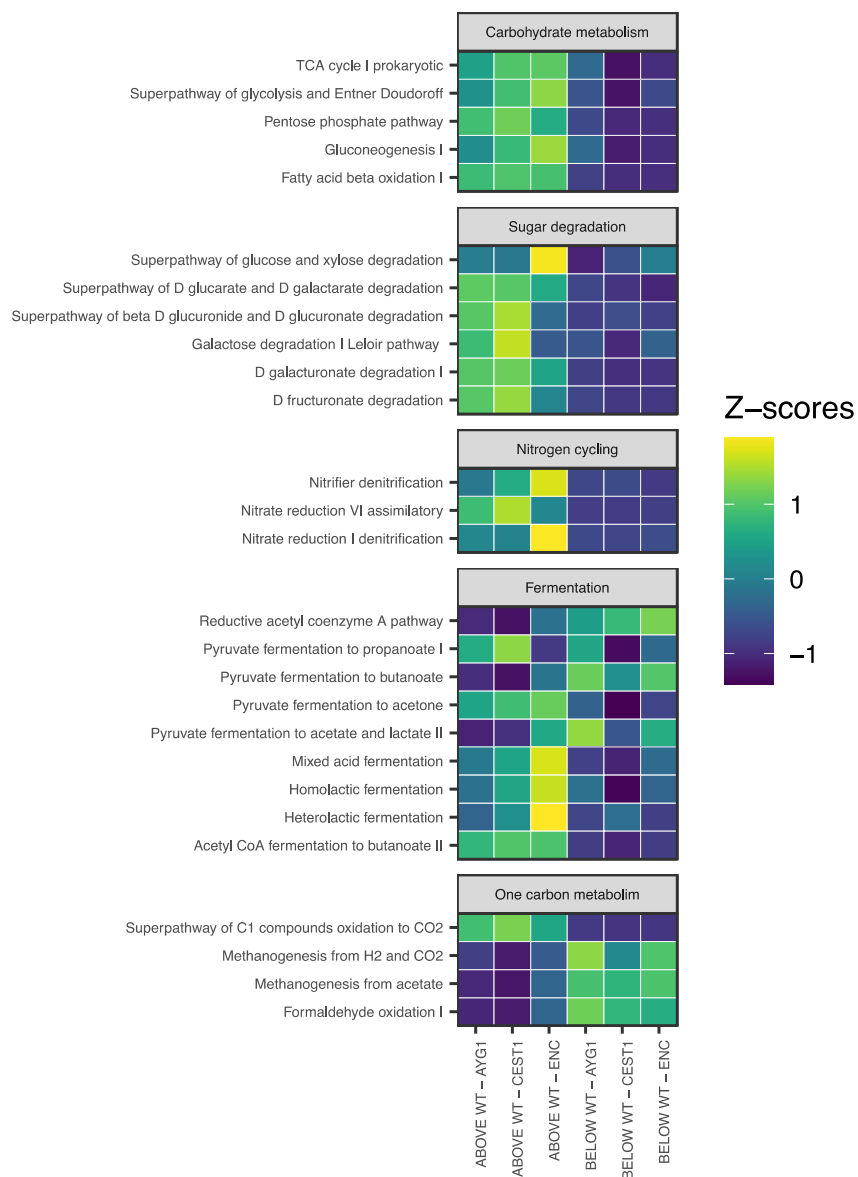
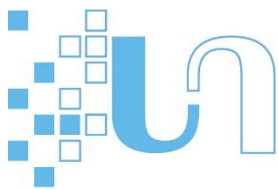
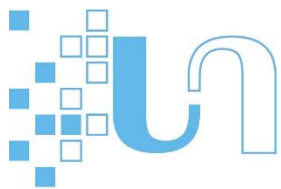


Figure IV.6. Heatmap of the normalized (Z-score) mean abundance of the 30 selected metabolic pathways in the 6 conditions tested (Above or below the water table vs the three peat cores) in the Indicator values (IndVal) analyses.

Yellow tones indicate a high abundance; drak blue tones indicated a low abundance. AYG₁ = Aigüestortes; CEST₁ = Clots de l'Estany and ENC = Encenrera.



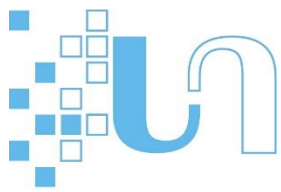
IV.4. DISCUSSION

In the study, we aimed at characterizing changes in microbial diversity and composition along a depth gradient in three distinct high-altitude peatlands of the Pyrenees. Three peat cores from three distinct Pyrenean peatlands were analyzed at fine resolution over the peat profile. Due to this high resolution, we were able to identify shifts in the taxonomic, phylogenetic and functional composition of microbial community and to further determine key drivers of microbial diversity and composition along the depth profile.

Peat profile characteristics reveal functionally distinct zones

The analysis of the peat cores reflects two crucial characteristics. The first one is the mineral inputs to the peat material and the second one is the average position and the fluctuation range of the water table.

The combination of bulk density and C/N ratios reveal three distinct vertical zones along the depth gradients for AYG₁ and CEST₁. The acrotelm, the mesotelm and the catotelm (cf. the polytelmic model Morris et al. 2011). The acrotelm (roughly between 0 and 10 cm, **Figure IV.2**) is the oxic zone receiving carbon input from plant production and is characterized by high C:N ratio (> 50) reflecting the presence of fresh and poorly decomposed *Sphagnum* (Lin et al., 2014; Tfaily et al., 2014). Indeed, *Sphagnum* tissue usually display low concentrations of nitrogen and decomposes slowly also due to high concentrations of inhibitory compounds (Aerts et al., 1999; Bridgham et al., 2002). High C:N ratio was also associated with low values of bulk density and high water content both indicative of well-preserved *Sphagnum* materials (Yu et al., 2003). This was followed by the mesotelm (between 10 and 25 cm, **Figure IV.2**), a transition zone, characterized in both AYG₁ and CEST₁ by a sharp decrease of C:N and water content concomitant with an increase of bulk density, all indicative of higher decomposed material (Frolking et al., 2010; Tfaily et al., 2014). The profile of AYG₁ showed, however, a singular pattern with a strong decrease of C coupled with high bulk density (> 0.2 g/cm³), indicating mixing with mineral phase for this shallow peat (Liu and Lennartz, 2019). For both AYG₁ and CEST₁, the stabilization of C:N approximately from 250 mm to the end of the profile is interpreted as the establishment of the catotelm (anoxic) with slower decomposition rate which is even clearer for CEST₁ where low C:N was also accompanied by a drop of bulk density and hence higher water content, both having been reported as key features of the catotelm (Tfaily et al., 2014). In contrast, ENC exhibited a more homogenous profile catotelm (i.e. low bulk density, high water content and low C:N), with no indication of highly aerated acrotelm. This could suggest that the water table is permanently high at this site. Field observations showed the presence of acrotelm/mesotelm the first 100 mm, though it was not clearly detectable in our data, probably due to the absence of *Sphagnum* which did not, in turn, generated high C:N in the first layers.

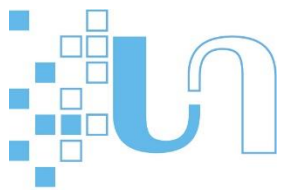


Pattern of prokaryotic diversity are shaped by peat profile

Patterns of microbial diversity and composition were scrutinized at three different levels of resolution: ASV, phylum and phylogenetic. For the three peat cores, ASV diversity strongly varied along the depth profile with overall higher ASV diversity on the top layers than in the deep peat. These findings are consistent with what have been reported in the literature for peat profiles with microbial diversity being typically higher in the shallowest (i.e. acrotelm) than in the deepest strata of the profile (i.e. catotelm) (e.g. Morales *et al.*, 2006, but see Preston *et al.*, 2012). This pattern might be explained by a higher amount, more labile and diverse carbon source, and available nutrients near the surface originating from plant detritus, litter, and surface water in the ace of fens. These conditions favor a wider spectrum of microorganisms (Fierer *et al.*, 2003, Galand *et al.*, 2003). The peaks of ASV diversity detected in AYG₁ and CEST₁ below the surface (around 150 mm) could be seen as the signature of the mesotelm as reported by previous authors (Lin *et al.*, 2014, Wang *et al.*, 2019) where they identified a hotspot of Prokaryotic diversity at mid-depth. At ENC the water table conservatively close to the surface leading to thinner aerate subsurface zone precludes the observation of this pattern as already noticed in similar situation by Wang *et al.* (2019). In contrast to ASV diversity, phylum and phylogenetic diversities exhibited positive relationship with depth. This could be explained by the fact that most of the dominant phyla in the acrotelm/mesotelm layer are still present in the catotelm. In addition to these phyla, archaeal phyla such as Crenarchaeota, and Euryarchaeota, and additional bacterial phyla such as Nitrospirae and Spirochaetes specifically adapted to the environmental conditions of the anoxic deep peat catotelm appear. This explains the high phylum and phylogenetic diversity throughout the profile (Lin *et al.*, 2014).

Our study reveals also an important change in ASV microbial composition between the first two layers located just beneath the vegetated surface (between 2 to 7 cm, **Figure IV.2C**) with a turn-over higher than 90% for the three cores. In addition to the resources filters previously mentioned, it is also likely that specific microorganisms associated to peatland vegetation above the surface contributed to exacerbate divergence across these two layers. Collectively, these findings suggest that changes in environmental conditions within the acrotelm can represent ecological filter with many surface-dwelling microorganisms being less likely to thrive in the conditions that prevail in the layers just below the surface.

Across the peat cores, ASV, phylum and phylogenetic compositional dissimilarity increased significantly with increasing spatial distance (i.e. depth gradient), a pattern that has been documented in several studies for very different types of peatlands (Morales *et al.*, 2006, Lin *et al.*, 2014, Too *et al.*, 2018). These distance-decay relationships indicated therefore that the structure and composition of the microbial communities changed markedly with depth. After having controlled for spatial distance, we also reported



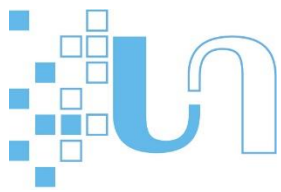
strong positive relationships between compositional dissimilarity at the three levels and difference in C, N and to a lesser extent in bulk density. These results are in line with many previous findings, emphasizing the importance of resource availability and peat property in structuring microbial communities in peat and, more generally across soil profile (e.g. Mondav *et al.*, 2017, Zhong *et al.*, 2017, Sun *et al.*, 2020). This also pinpoints that variations in microbial community composition along a depth profile are not only determined by broad environmental gradients such the oxygen gradient but that small scale variations in peat characteristics, reflecting fine-scale adaptation of microorganisms to distinct niches drives community patterns. Collectively, the results provide evidence that microbial communities are not randomly distributed throughout the depth gradient and their assembly is certainly determined by strong ecological processes operating along the peat profile (Hu *et al.*, 2015). Interestingly, the three zonations of the peat identified with the peat characteristics namely, the acro-, meso- and cato-telm was not clearly evidence in the diversity patterns across the peat profile.

The low dissimilarity in ASV, phylum, phylogenetic and functional composition between peatlands (**Figure IV.5**) suggest that the peatlands investigated in this study share a core set of microorganisms regardless their geographical locations in the Pyrenean mountains. It is worthy to note however, that these peatlands are not representative of all peatland types of the Pyrenees. AYG₁, CEST and ENC can be classified as fens. The three sites share similar conditions, in particular regarding pH, that is recognized as one of the main driver of microbial community composition in the environment (e.g. Fierer & Jackson, 2006, Lauber *et al.*, 2009, Bahram *et al.*, 2018). The narrow range of pH values in these peatlands certainly limit compositional divergence among peatlands. However, once can reasonably hypothesized that other Pyrenean peatlands could exhibit a different composition even though a structuration along the depth profile is still expected.

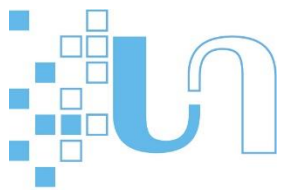
Community composition and functionality along the vertical gradient of the peat column

At the phylum level, the pattern in relative abundance clearly pointed out one main shift in the distribution of the prokaryotic microorganisms along the depth profile which perfectly matches with the acro/mesotelm delineation. Thus, we found a dominance of Acidobacteria, Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria and Actinobacteria in the oxic acrotelm and oxic-anoxic mesotelm while Chloroflexi, Bacteroidetes, Deltaproteobacteria and Crenarchaeota were dominant in the anoxic deeper layers in the catotelm.

Across the three peatlands, the upper layers are characterized by pathways involved in the degradation of sugars, the nitrogen cycle and fermentation, with marginal discrepancies. These differences may stem from aboveground plant cover diversity and related organic matter composition diversity (Brunel *et al.*, Ofaim *et al.*, 2017, Pang *et al.*, 2019). This difference is also reflected through the fluctuations of the C:N



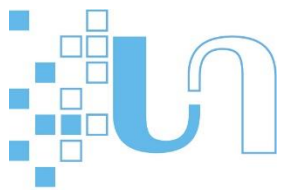
ratio in the three peatlands. As expected, CEST₁ and AYG₁ show a decreasing C:N ratio with depth, as peat is increasingly transformed by microbial communities along the depth gradient, decreasing C:N (Leifeld *et al.*, 2020). In contrast, ENC shows a more stable and lower C:N ratio, comparable with those observed in the deep layers of the two other cores as a consequence of anoxic conditions that prevail over most of the length of the core. By focusing on the compositional pattern along the peat profile, it is possible to better discern which are the main actors involved in the major processes of transformation and mineralization of organic matter in these mountainous peatlands. Thus, the distribution of Alphaproteobacteria and Gammaproteobacteria, in the upper layers may be attributed to a greater availability of the carbon pool (Fierer *et al.*, 2007) although some species potentially own the capacity to degrade large polysaccharides (Woodcroft *et al.*, 2018). Both Alphaproteobacteria and Gammaproteobacteria comprise also methanotrophs (Butterfield, *et al.*, 2016) that were however poorly represented in the oxic layers. Methanotrophs guild represented by NC10 Rokubacteria (Methylomirabilaceae) exhibit instead higher relative abundance. These bacteria have the capacity to couple CH₄ oxidation to nitrite reduction in anaerobic conditions (Lee, 2019, Versantvoort *et al.*, 2019). Collectively, these results suggests that although methanotrophic metabolic capacity in oxic conditions was higher in CEST₁ than in the other peatlands, which is consistent with the presence of low water-table there which may contribute to limit methane emission to the atmosphere (Fiedler and Sommer, 2000; Roslev and King, 1996; Segarra *et al.*, 2015), methane oxidation might also occur in the anoxic layers as indicated by the presence of anaerobic methanotrophs in all the three peatlands investigated. The co-occurrence of Acidobacteria, known to be preferentially associated with oligotrophic conditions (Fierer *et al.*, 2007, Philippot *et al.*, 2010, Kielak *et al.*, 2016), along with copiotrophic Alphaproteobacteria and Gammaproteobacteria, suggests that Acidobacteria occupy a different niche. Indeed, Acidobacteria harbor high metabolic potential for complex carbohydrate turnover that certainly allow them to mine more efficiently complex C in these layers, e.g. cellulose, hemicellulose and aromatic compounds, (Ausec *et al.*, 2009, Pankratov *et al.*, 2011, Woodcroft *et al.*, 2018, Diamond *et al.*, 2019). Nevertheless, the relative abundance of Acidobacteria was higher in the intermediate peat layers, specifically in AYG₁ and CEST₁ where they may find favorable conditions to their development. Consistently, the ratio of Proteobacteria to Acidobacteria suggested to be indicative of the trophic status across a range of soil ecosystems (Smit *et al.*, 2001) points indeed to an alteration of nutrients at this level in these peatlands (AYG₁: 1.026 ± 0.265 , CEST₁: 1.189 ± 0.498). In contrast, ENC exhibited a higher ratio (2.620 ± 1.067) which certainly reflects a higher nutriment system associated to lower relative abundance of Acidobacteria in this peatland. In contrast to Acidobacteria, Actinobacteria, the second most abundant phylum in the peatlands, may exhibit only cellulase and not xylanase encoding genes precluding these bacteria to degrade hemicellulosic plant material (Berlemont & Martiny, 2013, Woodcroft *et al.*, 2018).



Plantomycetes exhibited a distribution pattern quite similar to those of Acidobacteria although with a lower relative abundance. In accordance to (Dedysh & Ivanova, 2018) we found that these bacteria occurred both in aerobic and anoxic peat layers. Due to their high genome-encoded glycolytic potential (but see Berlemont & Martiny, 2013) it is assumed that they contribute to the degradation of complex C compounds. Intriguingly, one Planctomycetes representative, *Phycisphaerae* bacterium of the SG8-4 family, a not yet characterized sediment-dwelling bacteria representing nearly half of the representatives of this phylum, is strictly found in the anoxic layer. Its high relative abundance might suggest that this strain could play an important role in these peatlands. In the deep layers of the peat column, the most represented bacteria belong to the phylum of Chloroflexi. Ubiquitous in peatlands, Chloroflexi are ecologically and physiologically diverse as attested by their large distributional range through the peat profile. Overall Chloroflexi are principally detected in anaerobic habitats (Ward *et al.*, 2018, Speirs *et al.*, 2019) though aerobic taxa were evidenced in terrestrial environments (Yabe *et al.*, 2017). In the upper peat layers representatives of aerobic Chloroflexi belonging to Ktedonobacteria were indeed recorded. Interestingly, some representatives of Chloroflexi have the potential for respiring diverse carbon compounds whereas anaerobes taxa are likely involved in sugar and plant-derived-compound degradation such the Anaerolineales that dominate the Chloroflexi in the deepest layers of the peat cores. Chloroflexi are also known to be well adapted to survive in water-saturated soils explaining their prevalence in the deepest peat layers (Yun *et al.*, 2014). Concerning Deltaproteobacteria, their distribution along the peat profile clearly highlights their wide ecophysiological capacities (e.g. fermentation, sulfate reduction or iron reduction) with the aerobic Myxococcales occurring mainly on the top layers while the strict anaerobic Syntrophobacterales were the most main representatives of Deltaproteobacteria toward the bottom of the cores. Bacteroidetes, considered to have copiotrophic attributes, are recognized to contribute to the degradation of complex carbon compounds too (Fierer *et al.*, 2007, Fenchel *et al.*, 2012). They were also widespread along the depth gradient with the presumable aerobic order Chitinophagales and Cytophagales mostly present on the top layers and the anaerobic Bacteroidales and Kryptoniales in the deepest layers of the cores. In contrast, Firmicutes were poorly represented and constrained in the deepest peat strata.

Representatives of *Nitrospira* belonging to Thermodesulfobionia class were highly represented in the dataset. The ecophysiology of these bacteria are poorly understood and might likely be involved in sulphur and nitrogen cycling (Arshad *et al.*, 2017, Zecchin *et al.*, 2017).

The catotelm hosts most archaeal phyla, among which, Crenarchaeota, Euryarchaeota and Nanoarchaeota. Euryarchaeota are mostly dominated (around 80%) by methanogenic representatives, mainly Methanomicrobiales (formate-/H₂- and CO₂-utilizing) and to a lesser extent Methanosarcinales all belonging to the acetoclastic *Methanosaeta* genus (Evans *et al.*, 2019), together accounting for a total of

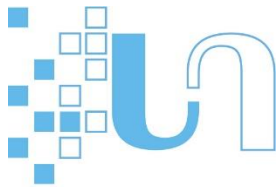


more than 91% of the functional guild (around 58% and 33%, respectively). Considering the relative abundance of Methanomicrobiales it is likely that hydrogenotrophic over acetoclastic methanogenesis contribute to substantial CH₄ production in the peatlands investigated. However, acetogenic bacteria which are particularly abundant in ENC and CEST₁ (mainly *Thermodesulfobacteria*, *Dehalococcoidia* and the family *Syntrophobacterales*), could alter this scenario by competing with the H₂/CO₂ that fuels the hydrogenotrophic microbes (De Graeve *et al.*, 1994, Dar *et al.*, 2008) and outcompete methanogenesis particularly at low temperatures (Fu *et al.*, 2019) but not at low H₂ concentrations (Kotsyurbenko *et al.*, 2001). Hydrogenotrophic methanogenesis would probably be supported by fermentation of propionate and butyrate (Schmidt *et al.*, 2015, Schmidt *et al.*, 2016). The high relative abundance of methanogens in ENC, supports the fact that high water table correlates with an increase in the relative abundance of methanogenes (Moore & Knowles, 1989, Rey-Sanchez *et al.*, 2019).

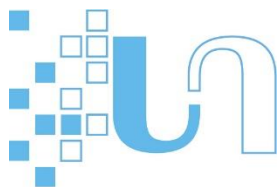
Overall, our study revealed that the compositional pattern of high altitudes peatlands along the peat profile was conserved over the five peat cores investigated (**Figure IV.3** and **Figure IV.7**) and more importantly was also consistent with the typical composition described in previous peatland studies (e.g. Lin *et al.*, 2014, Zhong *et al.*, 2017, Seward *et al.*, 2020). Collectively, this suggests that conditions prevailing in peatlands are strong environmental filters that shape the microbial community and its overall metabolic potential, including functions related to carbon cycling. Consistent with the taxonomic and phylogenetic patterns, community functionality inferred from 16S data show a strong structuration along the depth gradient irrespective to the geographic location. Hence the first stage of plant material degradation which involves the breakdown of high-molecular-weight plant-derived polysaccharides into smaller low-molecular-weight monosaccharides and their subsequent transformation into pyruvate occurs mainly in the acro-mesotelm, while fermentation and acetogenesis ensure further degradation in the catotelm where they fueled methanogenesis. At least part of methane may then be oxidized by methanotrophs either in the aerate peat and/or deeply through anaerobic oxidation coupled to nitrite reduction.

IV.5. CONCLUSION

Our study allowed deepening our knowledge on high-elevation Pyrenean peatlands by (1) revealing the vertically-structured patterns of prokaryotic communities and (2) inferring the ecological processes driving these patterns. Mountainous peatlands have received to date little attention despite their contribution in C dynamics. In the context, increasing research efforts are of critical importance to strengthen scientific understanding of peatland C dynamics in these ecosystems and participate in a better quantification of terrestrial carbon feedback on climate change (Yu *et al.*, 2011, Gallego-Sala *et al.*, 2018). Nevertheless,



significant knowledge gaps remain to be filled in many areas of peatland research. With regard to the microbial ecology of these ecosystems, we have yet to establish links between the composition of microbial communities and ecosystem functioning; particularly the link between Clymo's model, microbial composition and peat functioning merit further consideration. In mountain peatlands, which are subject to very specific climatic regimes, such investigations remain to be carried. The purpose of this study was also to document for the first time the microbial diversity of high-altitude Pyrenean peatlands. Pyrenean peatlands constitute a unique natural heritage which is, nowadays, threatened by global change. Our study, therefore, contribute to strength our knowledge on these emblematic ecosystems.



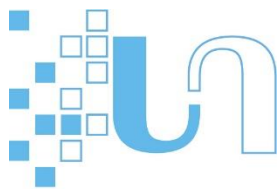
Supplementary Materials: The following are available online at g8, Appendix S1. Characteristics of the peat cores AYG₂ and CEST₂, **Figure IV.7**. Physical and chemical characterization for the peat cores AYG₂ and CEST₂, **Figure IV.8**. DNA-derived microbial community composition and diversity across the depth gradient for the peat cores AYG₂ and CEST₂.

Author Contributions: "Conceptualization, B.L., F.R. and E.R.; Methodology, B.L., F.R., G.L.R, L.G. F.D.V., A.B., B.K. and E.R.; Molecular Analysis, B.L. and E.R.; Statistical Analysis, F.R. and E.R.; Investigation, B.L., F.R. and E.R.; Writing – Original Draft Preparation, B.L., F.R. and E.R.; Writing – Review & Editing, B.L., F.R. and E.R.; Project Administration, B.L., G.L.R and L.G.; Funding Acquisition, B.L., G.L.R and L.G.", All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the European Union through the Interreg- POCTEFA territorial cooperation program through the OPCC project REPLIM Interreg V-A Spain-French-Andorra (POCTEFA 2014–2020).

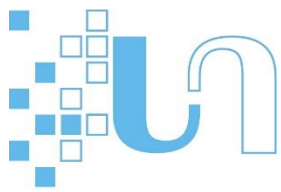
Acknowledgments: The authors wish to thank Thierry Camboulive for assisting in field sampling.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

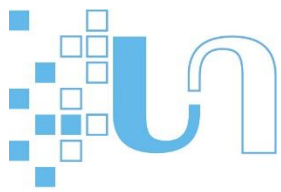


IV.6. REFERENCES

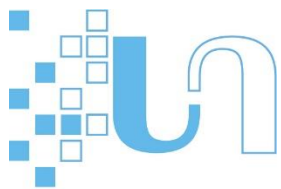
- Andersen R, Chapman S & Artz R (2013) Microbial communities in natural and disturbed peatlands: a review. *Soil Biol Biochem* **57**: 979-994.
- Anderson MJ (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol* **26**: 32-46.
- Arshad A, Dalcin Martins P, Frank J, Jetten MS, Op den Camp HJ & Welte CU (2017) Mimicking microbial interactions under nitrate-reducing conditions in an anoxic bioreactor: enrichment of novel Nitrospirae bacteria distantly related to *Thermodesulfovibrio*. *Environ Microbiol* **19**: 4965-4977.
- Asemaninejad A, Thorn RG & Lindo Z (2017) Vertical distribution of fungi in hollows and hummocks of boreal peatlands. *Fungal Ecol* **27**: 59-68.
- Asemaninejad A, Thorn RG, Branfireun BA & Lindo Z (2019) Vertical stratification of peatland microbial communities follows a gradient of functional types across hummock-hollow microtopographies. *Ecoscience* **26**: 249-258.
- Ausec L, Kraigher B & Mandic-Mulec I (2009) Differences in the activity and bacterial community structure of drained grassland and forest peat soils. *Soil Biol Biochem* **41**: 1874-1881.
- Bahram M, Hildebrand F, Forslund SK, *et al.* (2018) Structure and function of the global topsoil microbiome. *Nature* **560**: 233-237.
- Barbera P, Kozlov AM, Czech L, Morel B, Darriba D, Flouri T & Stamatakis A (2019) EPA-ng: massively parallel evolutionary placement of genetic sequences. *Syst Biol* **68**: 365-369.
- Berlemont R & Martiny AC (2013) Phylogenetic distribution of potential cellulases in bacteria. *Appl Environ Microbiol* **79**: 1545-1554.
- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M & Asnicar F (2019) Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* **37**: 852-857.
- Brunel C, Da Silva A-MF & Gros R Environmental drivers of microbial functioning in Mediterranean forest soils. *Microb Ecol* **1-13**.
- Cáceres MD & Legendre P (2009) Associations between species and groups of sites: indices and statistical inference. *Ecology* **90**: 3566-3574.
- Cardoso P, Rigal F & Carvalho JC (2015) BAT-Biodiversity Assessment Tools, an R package for the measurement and estimation of alpha and beta taxon, phylogenetic and functional diversity. *Methods Ecol Evol* **6**: 232-236.
- Charman D (2009) Peat and Peatlands. *Encyclopedia of Inland Waters*, (Likens GE & Tockner K, eds.), p. 541-548. Elsevier Science.
- Chen H, Yang G, Peng C, Zhang Y, Zhu D, Zhu Q, Hu J, Wang M, Zhan W & Zhu E (2014) The carbon stock of alpine peatlands on the Qinghai-Tibetan Plateau during the Holocene and their future fate. *Quat Sci Rev* **95**: 151-158.
- Chimner RA, Lemly JM & Cooper DJ (2010) Mountain fen distribution, types and restoration priorities, San Juan Mountains, Colorado, USA. *Wetlands* **30**: 763-771.
- Clymo R (1984) The limits to peat bog growth. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* **303**: 605-654.
- Clymo RS & Bryant CL (2008) Diffusion and mass flow of dissolved carbon dioxide, methane, and dissolved organic carbon in a 7-m deep raised peat bog. *Geochim Cosmochim Acta* **72**: 2048-2066.
- Cooper DJ, Chimner RA & Merritt DM (2012) Western mountain wetlands. *Wetland Habitats of North America: Ecology and Conservation Concerns*, p. 313-328. University of California Press: Berkeley, CA, USA, Berkeley.



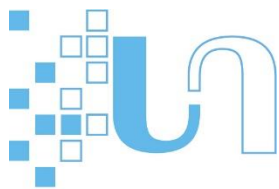
- Cubizolle H & Thébaud G (2014) A geographical model for the altitudinal zonation of mire types in the uplands of western Europe: the example of Les Monts du Forez in eastern France. *Mires & Peat* **15**.
- Czech L, Barbera P & Stamatakis A (2020) Genesis and Gappa: processing, analyzing and visualizing phylogenetic (placement) data. *Bioinformatics* **36**: 3263-3265.
- Dar SA, Kleerebezem R, Stams AJ, Kuenen JG & Muyzer G (2008) Competition and coexistence of sulfate-reducing bacteria, acetogens and methanogens in a lab-scale anaerobic bioreactor as affected by changing substrate to sulfate ratio. *Appl Microbiol Biotechnol* **78**: 1045-1055.
- De Graeve KG, Grivet JP, Durand M, Beaumatin P, Cordelet C, Hannequart G & Demeyer D (1994) Competition between reductive acetogenesis and methanogenesis in the pig large-intestinal flora. *Journal of Applied Bacteriology* **76**: 55-61.
- Dedysh SN & Ivanova AA (2018) Planctomycetes in boreal and subarctic wetlands: diversity patterns and potential ecological functions. *FEMS Microbiol Ecol* **95**.
- Deng Y, Cui X, Hernández M & Dumont MG (2014) Microbial diversity in hummock and hollow soils of three wetlands on the Qinghai-Tibetan plateau revealed by 16S rRNA pyrosequencing. *PLoS One* **9**: e103115.
- Diamond S, Andeer PF, Li Z, *et al.* (2019) Mediterranean grassland soil C–N compound turnover is dependent on rainfall and depth, and is mediated by genomically divergent microorganisms. *Nat Microbiol* **4**: 1356-1367.
- Dodson J (1987) Mire development and environmental change, Barrington Tops, New South Wales, Australia. *Quatern Res* **27**: 73-81.
- Douglas GM, Maffei VJ, Zaneveld JR, Yurgel SN, Brown JR, Taylor CM, Huttenhower C & Langille MG (2020) PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nat Biotechnol* **1-5**.
- Dudová L, Hájková P, Buchtová H & Opravilová V (2013) Formation, succession and landscape history of Central-European summit raised bogs: a multiproxy study from the Hrubý Jeseník Mountains. *The Holocene* **23**: 230-242.
- Evans PN, Boyd JA, Leu AO, Woodcroft BJ, Parks DH, Hugenholtz P & Tyson GW (2019) An evolving view of methane metabolism in the Archaea. *Nature Reviews Microbiology* **17**: 219-232.
- Fenchel T, King GM & Blackburn TH (2012) Appendix 2 - Phylogeny and Function in Biogeochemical Cycles. *Bacterial Biogeochemistry (Third Edition)*, (Fenchel T, King GM & Blackburn TH, eds.), p. 247-253. Academic Press, Boston.
- Fierer N & Jackson RB (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 626-631.
- Fierer N, Schimel JP & Holden PA (2003) Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biol Biochem* **35**: 167-176.
- Fierer N, Bradford MA & Jackson RB (2007) Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* **88**: 1354-1364.
- Fierer N, McCain CM, Meir P, Zimmermann M, Rapp JM, Silman MR & Knight R (2011) Microbes do not follow the elevational diversity patterns of plants and animals. *Ecology* **92**: 797-804.
- Fu B, Jin X, Conrad R, Liu H & Liu H (2019) Competition between chemolithotrophic acetogenesis and hydrogenotrophic methanogenesis for exogenous H₂/CO₂ in anaerobically digested sludge: impact of temperature. *Front Microbiol* **10**: 2418.
- Galand PE, Fritze H & Yrjälä K (2003) Microsite-dependent changes in methanogenic populations in a boreal oligotrophic fen. *Environ Microbiol* **5**: 1133-1143.
- Gallego-Sala AV, Charman DJ, Brewer S, *et al.* (2018) Latitudinal limits to the predicted increase of the peatland carbon sink with warming. *Nature Climate Change* **8**: 907-913.



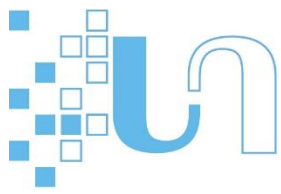
- Gorham E (1991) Northern peatlands: role in the carbon cycle and probable responses to climatic warming. *Ecol Appl* **1**: 182-195.
- Haegeman B, Hamelin J, Moriarty J, Neal P, Dushoff J & Weitz JS (2013) Robust estimation of microbial diversity in theory and in practice. *ISME J* **7**: 1092-1101.
- Hribljan J, Cooper D, Sueltenfuss J, Wolf E, Heckman K, Lilleskov E & Chimner R (2015) Carbon storage and long-term rate of accumulation in high-altitude Andean peatlands of Bolivia. *Mires and Peat* **15**: Article 12.
- Hu W, Zhang Q, Tian T, Li D, Cheng G, Mu J, Wu Q, Niu F, Stegen JC & An L (2015) Relative roles of deterministic and stochastic processes in driving the vertical distribution of bacterial communities in a permafrost core from the Qinghai-Tibet Plateau, China. *PLoS One* **10**: e0145747.
- Ingram H (1978) Soil layers in mires: function and terminology. *J Soil Sci* **29**: 224-227.
- Ivanova AA, Wegner C-E, Kim Y, Liesack W & Dedysh SN (2016) Identification of microbial populations driving biopolymer degradation in acidic peatlands by metatranscriptomic analysis. *Mol Ecol* **25**: 4818-4835.
- Joosten H, Tanneberger F, Moen A (2017) Mires and peatlands of Europe. Status, distribution and conservation. Schweizerbart Science Publishers.
- Juan-Ovejero R, Briones MJJ & Öpik M (2020) Fungal diversity in peatlands and its contribution to carbon cycling. *Applied Soil Ecology* **146**: 103393.
- Kielak AM, Barreto CC, Kowalchuk GA, van Veen JA & Kuramae EE (2016) The ecology of Acidobacteria: moving beyond genes and genomes. *Front Microbiol* **7**: 744.
- Kotsyurbenko OR, Glagolev MV, Nozhevnikova AN & Conrad R (2001) Competition between homoacetogenic bacteria and methanogenic archaea for hydrogen at low temperature. *FEMS Microbiol Ecol* **38**: 153-159.
- Lauber CL, Hamady M, Knight R & Fierer N (2009) Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl Environ Microbiol* **75**: 5111-5120.
- Lee EY (2019) *Methanotrophs: Microbiology Fundamentals and Biotechnological Applications*. Springer Nature.
- Leifeld J & Menichetti L (2018) The underappreciated potential of peatlands in global climate change mitigation strategies. *Nature Communications* **9**: 1071.
- Leifeld J, Klein K & Wüst-Galley C (2020) Soil organic matter stoichiometry as indicator for peatland degradation. *Sci Rep* **10**: 1-9.
- Lin X, Tfaily MM, Green SJ, Steinweg JM, Chanton P, Invittaya A, Chanton JP, Cooper W, Schadt C & Kostka JE (2014) Microbial metabolic potential for carbon degradation and nutrient (nitrogen and phosphorus) acquisition in an ombrotrophic peatland. *Appl Environ Microbiol* **80**: 3531-3540.
- Lin X, Tfaily MM, Steinweg JM, Chanton P, Esson K, Yang ZK, Chanton JP, Cooper W, Schadt CW & Kostka JE (2014) Microbial community stratification linked to utilization of carbohydrates and phosphorus limitation in a boreal peatland at Marcell experimental forest, Minnesota, USA. *Appl Environ Microbiol* **80**: 3518-3530.
- Lluch J, Servant F, Païssé S, et al. (2015) The characterization of novel tissue microbiota using an optimized 16S metagenomic sequencing pipeline. *PLoS One* **10**.
- Louca S & Doebeli M (2018) Efficient comparative phylogenetics on large trees. *Bioinformatics* **34**: 1053-1055.
- Lozupone C & Knight R (2005) UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8228-8235.



- Maltby E & Immirzi P (1993) Carbon dynamics in peatlands and other wetland soils regional and global perspectives. *Chemosphere* **27**: 999-1023.
- McCain CM (2005) Elevational gradients in diversity of small mammals. *Ecology* **86**: 366-372.
- McCain CM (2007) Could temperature and water availability drive elevational species richness patterns? A global case study for bats. *Global Ecol Biogeogr* **16**: 1-13.
- Mondav R, McCalley CK, Hodgkins SB, Frolking S, Saleska SR, Rich VI, Chanton JP & Crill PM (2017) Microbial network, phylogenetic diversity and community membership in the active layer across a permafrost thaw gradient. *Environ Microbiol* **19**: 3201-3218.
- Moore T & Knowles R (1989) The influence of water table levels on methane and carbon dioxide emissions from peatland soils. *Can J Soil Sci* **69**: 33-38.
- Morales SE, Mouser PJ, Ward N, Hudman SP, Gotelli NJ, Ross DS & Lewis TA (2006) Comparison of bacterial communities in New England Sphagnum bogs using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). *Microb Ecol* **52**: 34-44.
- Nichols JE & Peteet DM (2019) Rapid expansion of northern peatlands and doubled estimate of carbon storage. *Nat Geosci* **12**: 917-921.
- Ofaim S, Ofek-Lazar M, Sela N, Jinag J, Kashi Y, Minz D & Freilich S (2017) Analysis of microbial functions in the rhizosphere using a metabolic-network based framework for metagenomics interpretation. *Front Microbiol* **8**: 1606.
- Pang D, Wang G, Liu Y, Cao J, Wan L, Wu X & Zhou J (2019) The impacts of vegetation types and soil properties on soil microbial activity and metabolic diversity in subtropical forests. *Forests* **10**: 497.
- Pankratov TA, Ivanova AO, Dedysh SN & Liesack W (2011) Bacterial populations and environmental factors controlling cellulose degradation in an acidic Sphagnum peat. *Environ Microbiol* **13**: 1800-1814.
- Paradis E, Claude J & Strimmer K (2004) APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* **20**: 289-290.
- Philippot L, Andersson SGE, Battin TJ, Prosser JI, Schimel JP, Whitman WB & Hallin S (2010) The ecological coherence of high bacterial taxonomic ranks. *Nat Rev Micro* **8**: 523-529.
- Preston M, Smemo K, McLaughlin J & Basiliko N (2012) Peatland microbial communities and decomposition processes in the James Bay lowlands, Canada. *Front Microbiol* **3**.
- R Development Core t (2018) A language and environment for statistical computing. *R Found Stat Comput Vienna, Austria* **2**.
- Rey-Sanchez C, Bohrer G, Slater J, Li Y-F, Grau-Andrés R, Hao Y, Rich VI & Davies GM (2019) The ratio of methanogens to methanotrophs and water-level dynamics drive methane transfer velocity in a temperate kettle-hole peat bog. *Biogeosciences* **16**: 3207-3231.
- Schmidt O, Horn MA, Kolb S & Drake HL (2015) Temperature impacts differentially on the methanogenic food web of cellulose-supplemented peatland soil. *Environ Microbiol* **17**: 720-734.
- Schmidt O, Hink L, Horn MA & Drake HL (2016) Peat: home to novel syntrophic species that feed acetate- and hydrogen-scavenging methanogens. *ISME J* **10**: 1954-1966.
- Seward J, Carson MA, Lamit LJ, Basiliko N, Yavitt JB, Lilleskov E, Schadt CW, Smith DS, McLaughlin J & Mykityczuk N (2020) Peatland microbial community composition is driven by a natural climate gradient. *Microb Ecol*.
- Smit E, Leeflang P, Gommans S, van den Broek J, van Mil S & Wernars K (2001) Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2284-2291.
- Smouse PE, Long JC & Sokal RR (1986) Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Syst Zool* **35**: 627-632.



- Speirs LBM, Rice DTF, Petrovski S & Seviour RJ (2019) The phylogeny, biodiversity, and ecology of the Chloroflexi in activated sludge. *Front Microbiol* **10**.
- Squeo F, Warner B, Aravena R & Espinoza D (2006) Bofedales: high altitude peatlands of the central Andes. *Rev Chil Hist Nat* **79**: 245-255.
- Sun T, Wang Y, Hui D, Jing X & Feng W (2020) Soil properties rather than climate and ecosystem type control the vertical variations of soil organic carbon, microbial carbon, and microbial quotient. *Soil Biol Biochem* **148**: 107905.
- Tang M, Li L, Wang X, You J, Li J & Chen X (2020) Elevational is the main factor controlling the soil microbial community structure in alpine tundra of the Changbai Mountain. *Sci Rep* **10**: 12442.
- Tian W, Wang H, Xiang X, Wang R & Xu Y (2019) Structural Variations of Bacterial Community Driven by Sphagnum Microhabitat Differentiation in a Subalpine Peatland. *Front Microbiol* **10**: 1661-1661.
- Too CC, Keller A, Sickel W, Lee SM & Yule CM (2018) Microbial community structure in a malaysian tropical peat swamp forest: the influence of tree species and depth. *Front Microbiol* **9**.
- Tsitko I, Lusa M, Lehto J, Parviainen L, Ikonen ATK, Lahdenper? A-M & Bomberg M (2014) The variation of microbial communities in a depth profile of an acidic, nutrient-poor boreal bog in Southwestern Finland. *Open Journal of Ecology* **Vol.04No.13**: 28.
- Versantvoort W, Guerrero-Castillo S, Wessels HJCT, van Niftrik L, Jetten MSM, Brandt U, Reimann J & Kartal B (2019) Complexome analysis of the nitrite-dependent methanotroph *Methylomirabilis lanthanidiphila*. *Biochim Biophys Acta* **1860**: 734-744.
- Wang M, Tian J, Bu Z, Lamit LJ, Chen H, Zhu Q & Peng C (2019) Structural and functional differentiation of the microbial community in the surface and subsurface peat of two minerotrophic fens in China. *Plant Soil* **437**: 21-40.
- Ward LM, Hemp J, Shih PM, McGlynn SE & Fischer WW (2018) Evolution of phototrophy in the Chloroflexi phylum driven by horizontal gene transfer. *Front Microbiol* **9**.
- Woodcroft BJ, Singleton CM, Boyd JA, et al. (2018) Genome-centric view of carbon processing in thawing permafrost. *Nature* **560**: 49-54.
- Yabe S, Sakai Y, Abe K & Yokota A (2017) Diversity of Ktedonobacteria with Actinomycetes-Like morphology in terrestrial environments. *Microbes Environ* **32**: 61-70.
- Ye Y & Doak TG (2009) A parsimony approach to biological pathway reconstruction/inference for genomes and metagenomes. *PLoS Comput Biol* **5**: e1000465.
- Yu Z, Loisel J, Brosseau DP, Beilman DW & Hunt SJ (2010) Global peatland dynamics since the Last Glacial Maximum. *Geophys Res Lett* **37**.
- Yu Z, Beilman DW, Froking S, MacDonald GM, Roulet NT, Camill P & Charman DJ (2011) Peatlands and their role in the global carbon cycle. *Eos, Transactions American Geophysical Union* **92**: 97-98.
- Yun J, Ju Y, Deng Y & Zhang H (2014) Bacterial community structure in two permafrost wetlands on the Tibetan Plateau and Sanjiang Plain, China. *Microb Ecol* **68**: 360-369.
- Zecchin S, Corsini A, Martin M & Cavalca L (2017) Influence of water management on the active root-associated microbiota involved in arsenic, iron, and sulfur cycles in rice paddies. *Appl Microbiol Biotechnol* **101**: 6725-6738.
- Zhong Q, Chen H, Liu L, He Y, Zhu D, Jiang L, Zhan W & Hu J (2017) Water table drawdown shapes the depth-dependent variations in prokaryotic diversity and structure in Zoige peatlands. *FEMS Microbiol Ecol* **93**: fix049-fix049.



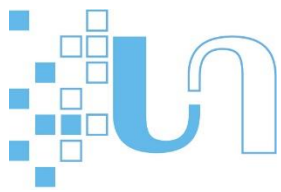
Supplementary materials

Appendix S1.

Peat characteristics and diversity patterns for the two additional cores AYG2 and CEST2.

For the peatlands Aigüestortes and Clots de l'Estany, one additional core was collected near the core analyzed in the main text i.e. namely AYG2 near AYG1 in Aigüestortes (Spain) and CEST2 near CEST1 in Clots de l'Estany (Andorra). The size of the cores was 36 and 41 cm, representing a total 9 and 10 samples along the depth gradient for AYG2 and CEST2 respectively. Both cores only included the peat layers above the water table.

Peat characteristics (bulk density, water content, C, N and C:N ratio) of AYG2 and CEST2 are presented in **Figure IV.7**. Very similar patterns were obtained between the two cores of the same peatland when comparing patterns throughout the same length. Pearson's correlations between peat characteristics and depth were: bulk density: $r = 0.92$, $P = 0.001$; water content: $r = -0.92$, $P < 0.001$; C: $r = -0.89$, $P = 0.001$; N: $r = 0.85$, $P = 0.004$ and C:N: $r = 0.86$, $P = 0.002$; for AYG2 and bulk density: $r = -0.91$, $P < 0.001$; water content: $r = -0.87$, $P < 0.001$; C: $r = -0.88$, $P < 0.001$; N: $r = 0.53$, $P = 0.122$ and C:N: $r = -0.93$, $P < 0.001$ for CEST2. Change in relative abundance and diversity patterns (alpha and beta diversity) along the depth gradient are presented in **Figure IV.8**. As for peat characteristics, very similar diversity patterns were obtained between the two cores of the same peatland when comparing patterns throughout the same length, corresponding only to the layers above the water table. Overall, a dominance of Acidobacteria, α -proteobacteria, γ -proteobacteria and Actinobacteria were reported. However, the relative abundance of Chloroflexi was found to be higher in AYG2 than in the top layers of AYG1 (**Figure IV.8A**). Because both cores were collected above the water table (absence of anoxic conditions), Archaea were almost absent from the samples, representing only 2.3 and 2.1% of the ASVs and 1.4 and 1.1% of the sequences for AYG2 and CEST2 respectively. Patterns of beta diversity calculated between consecutive pairs of samples (**Figure IV.2B**) differed between AYG2 and AYG1 with a shift in ASV and phylum composition detected at 25 cm below the surface for AYG2 but absent in AYG1. Both CEST1 and CEST2 showed similar trends when comparing patterns throughout the same length with a shift in the first centimeters of the cores following by a slight but continuous increase in beta diversity (**Figure IV.8B**, see **Figure IV.3B** in the main text). Overall, all the Mantel tests performed for AYG2 and CEST2 showed a positive and significant relationship between ASV, phylogenetic and phylum-based beta diversity and distance in depth for all three cores (all $r > 0.39$, all $P < 0.01$) indicating strong turn-over in microbial community composition along the depth



gradient except for phylogenetic beta diversity for CEST₂ where no significant relationship with the distance in depth was detected ($r > 0.22$, all $P < 0.12$). Patterns of the exponential of Shannon (e^H) for the three diversity levels (ASV, Phylum and phylogeny) showed similar trends between AYG₁ and AYG₂ and between CEST₁ and CEST₂ when comparing patterns throughout the same length (**Figure IV.8C**, see **Figure IV.3C** in the main text). ASV and Phylum based e^H showed no significant correlation with depth for AYG₂ and CEST₂ (ASV: $r = -0.12$, $P = 0.74$ and Phylum: $r = 0.55$, $P = 0.12$ for AYG₂ and ASV: $r = -0.21$, $P = 0.55$ and Phylum: $r = 0.49$, $P = 0.15$ for CEST₂). In contrast, phylogenetic-based e^H showed marginally significant and positive relationship with depth for both AYG₂ and CEST₂ ($r = 0.77$, $P = 0.04$ and $r = 0.66$, $P = 0.04$, respectively).

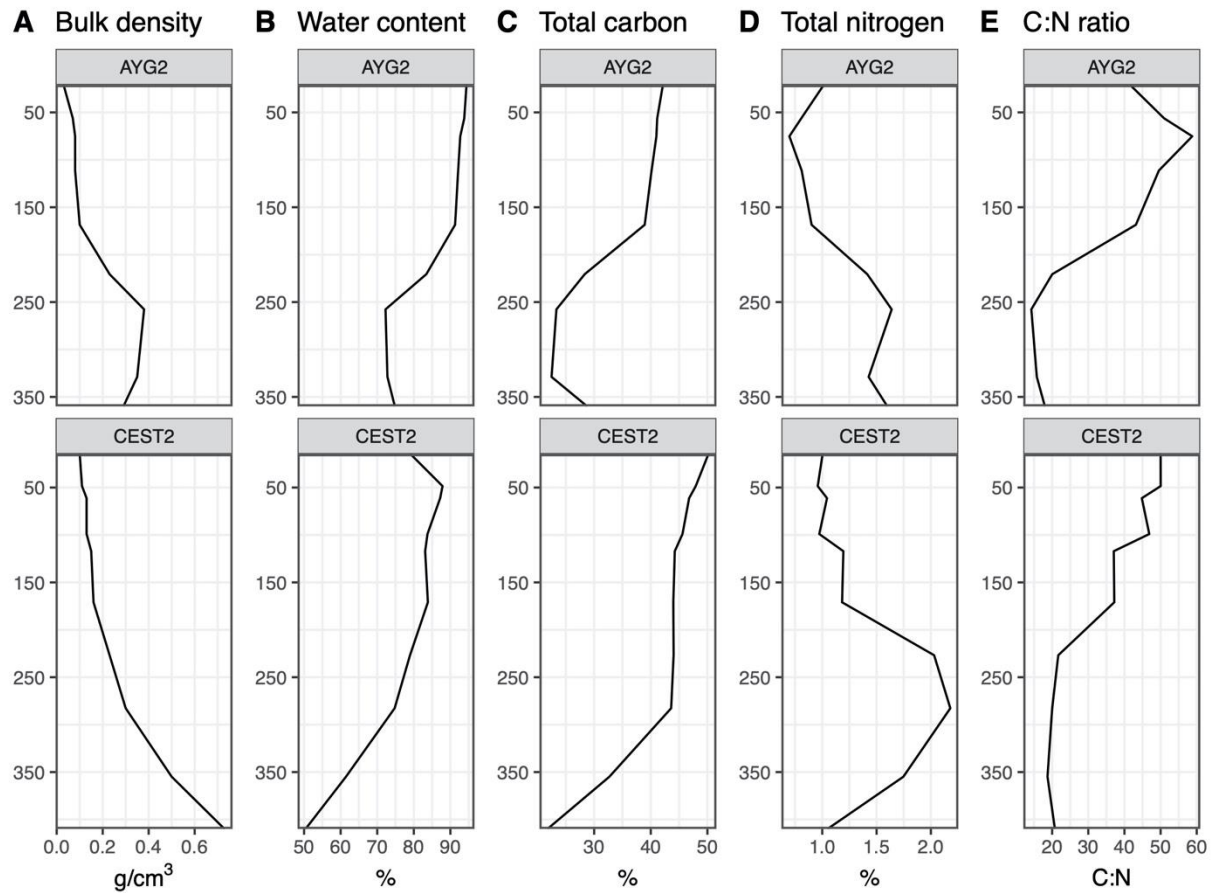
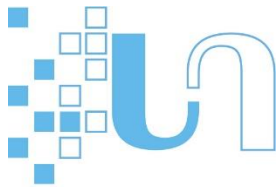


Figure IV.7. Physical and chemical characterization for the two additional cores AYG2 and CEST2 collected in the peatlands Aigüestortes and Clots de l'Estany respectively.

Each profile is based on an analysis at fine resolution of each peat core from the surface to the maximum depth of each core.

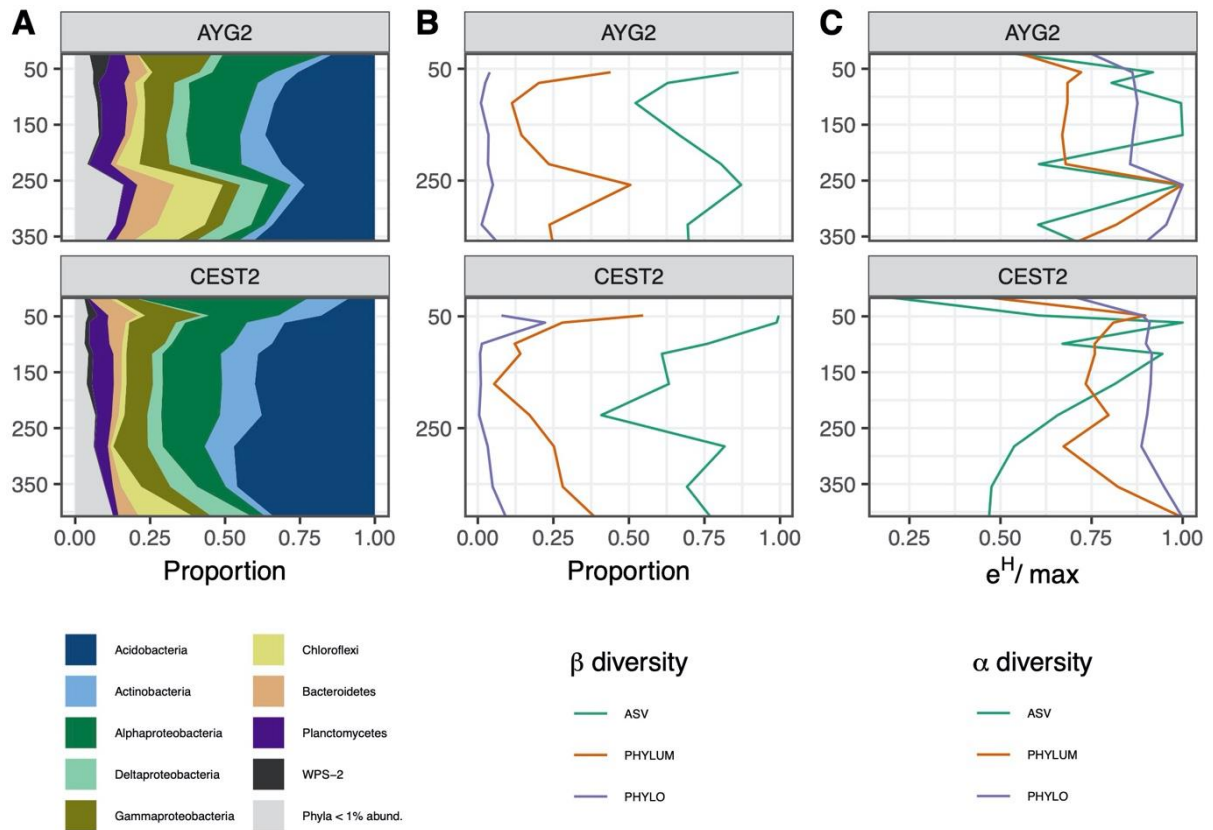


Figure IV.8. DNA-derived microbial community composition and diversity across the depth gradient for the two additional cores AYG2 and CEST2 collected in the peatlands Aigüestortes and Clots de l'Estany respectively.

(A) stacked plots of the relative abundance at the phylum level (B) changes in beta diversity (calculated with the index β_{repl}) between pairs of consecutive samples for ASV, phylum and phylogenetic diversity and (C) variation in alpha diversity (calculated with the exponential of Shannon, e^H) for ASV, phylum and phylogenetic diversity. To visualize the variations of three e^H in the same plot, values of e^H were standardized by the maximum value so that e^H is constrained between 0 and 1.

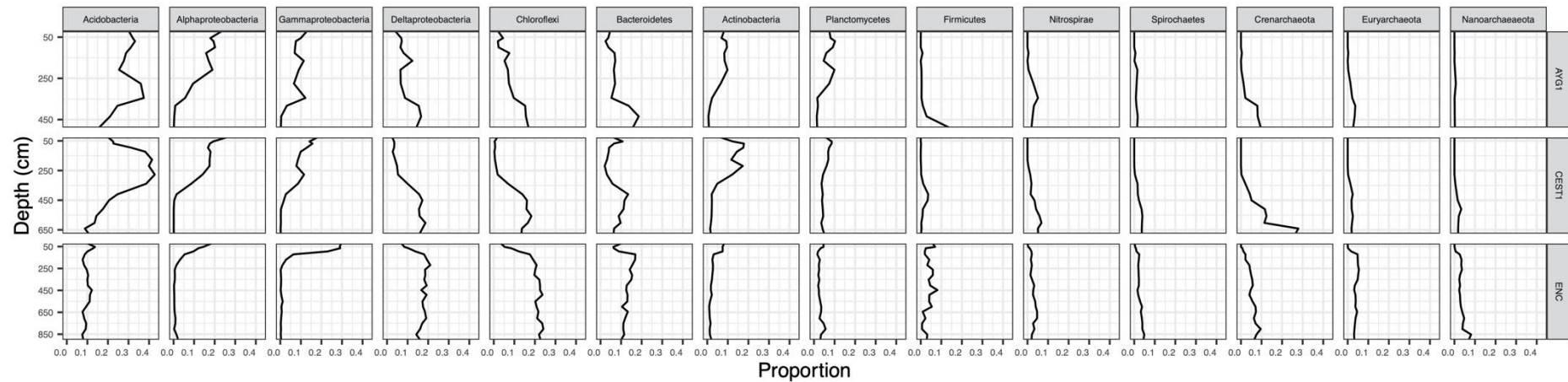
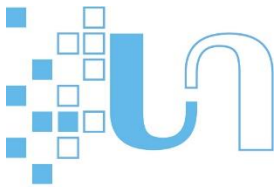


Figure IV.9. Variation of the relative abundance of the 14 most abundant taxa at phylum level along the depth gradient, except for the phylum Proteobacteria for which the relative abundance of the 3 major classes (alpha, gamma and delta) are shown.

Each profile is based on an analysis at fine resolution of each peat core from the surface to the maximum depth of each core. AYG1= Aigüestortes; CEST1 = Clots de l'Estany and ENC = Encenrera.

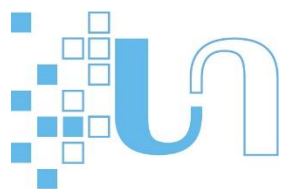
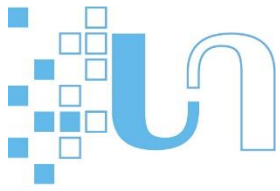
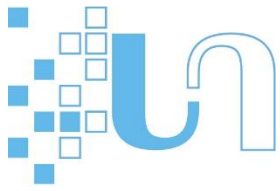


Table IV-3. Pearson's correlation between relative abundance of the 14 most abundant taxa at phylum level and the depth gradient, except for the phylum Proteobacteria for which the relative abundance of the 3 major classes (alpha, gamma and delta) are shown.

The *r* coefficient as well as the *P*-value (*P*) associated to the test are given. Grey cells are negative relationships. Significant results are marked in bold. AYG₁= Aigüestortes; CEST₁ = Clots de l'Estany and ENC = Encenrera.

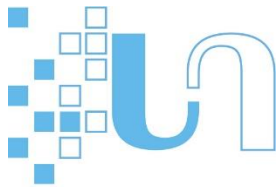
Phylum Class	AYG ₁		CEST ₁		ENC	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
Acidobacteria	-0.555	0.061	-0.606	0.013	-0.465	0.034
<i>Alphaproteobacteria</i>	-0.959	<0.001	-0.949	<0.001	-0.666	0.001
<i>Gammaproteobacteria</i>	-0.710	0.010	-0.945	<0.001	-0.677	0.001
<i>Deltaproteobacteria</i>	0.797	0.002	0.946	<0.001	0.351	0.119
Chloroflexi	0.948	<0.001	0.909	<0.001	0.733	<0.001
Bacteroidetes	0.858	<0.001	0.389	0.137	0.003	0.990
Actinobacteria	-0.881	<0.001	-0.825	<0.001	-0.764	<0.001
Planctomycetes	-0.821	0.001	-0.794	<0.001	0.279	0.221
Firmicutes	0.643	0.024	0.330	0.212	-0.381	0.088
Nitrospirae	0.763	0.004	0.942	<0.001	0.660	0.001
Spirochaetes	0.843	0.001	0.957	<0.001	0.916	<0.001
Crenarchaeota	0.888	<0.001	0.858	<0.001	0.908	<0.001
Euryarchaeota	0.917	<0.001	0.904	<0.001	0.304	0.181
Nanoarchaeaeota	0.396	0.202	0.855	<0.001	0.825	<0.001





Partie n°5

L'influence de l'hétérogénéité environnementale dans les variations de la diversité et de la composition des communautés microbiennes dans une tourbière de montagne



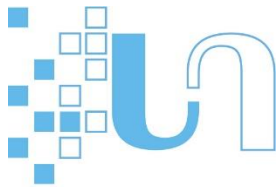
Partie V. L'influence de l'hétérogénéité environnementale dans les variations de la diversité et de la composition des communautés microbiennes dans une tourbière de montagne

Le travail présenté dans ce chapitre a été réalisé en collaboration avec des membres du Laboratoire ECOLAB (UMR 5245) de l'université de Toulouse, Laure Gandois et Pilar Durantez Jimenez, collaboration qui s'est traduite par le prêt de matériels de terrain, la collecte de certains paramètres environnementaux et la participation aux discussions sur la mise en place du protocole expérimental.

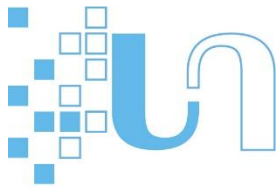
Contexte de l'étude

Dans le chapitre n°3, nous avons mis en évidence que les trois tourbières d'altitude échantillonnées dans les Pyrénées possédaient des caractéristiques environnementales et des communautés microbiennes relativement proches. Dans cette étude, nous avons identifié le gradient de profondeur comme un facteur déterminant dans la structuration des communautés microbiennes. Ce gradient de profondeur a un effet sur la structure des communautés plus important encore que l'identité même des tourbières, montrant ainsi une forme de convergence dans les patrons de diversité (alpha et beta) du moins, entre les trois tourbières étudiées. Au-delà de la profondeur, nous avons pu également mettre en évidence l'influence, certes marginale, de paramètres tels que la densité apparente de la tourbe et le ratio carbone-sur-azote (C:N) sur la composition des communautés laissant penser que d'autres gradients écologiques sont certainement impliqués dans les variations de diversité observées.

Dans ce quatrième chapitre, nous avons décidé de nous focaliser sur une seule tourbière et d'analyser la dynamique des communautés microbiennes à travers l'entière complexité du paysage. Pour cela, nous avons mis en place un protocole d'échantillonnage optimisé pour révéler les effets de l'hétérogénéité environnementale d'une tourbière sur les variations de la diversité microbienne à fines échelles. Nous avons choisi de travailler sur la tourbière pyrénéenne de Bernadouze (France, Ariège, Haute vallée du Vicdessos) qui a l'avantage de déjà posséder des dispositifs de suivi (station météo, piézomètres, sondes multi-paramètres à demeure) mis en place dans le cadre d'un Observatoire-Hommes-Milieus (OHM Pyrénées Haut Vicdessos -CNRS) et suivi par le Laboratoire Ecolab de l'Université de Toulouse. Bernadouze est également une tourbière considérée comme mixte avec la présence d'un bas-marais (minérotrophe) et d'un haut-marais (ombrotrophe).



Dans cette étude, nous avons donc cherché (1) à caractériser les différentes sources de variation de paramètres environnementaux clés de la tourbe (i.e. température, pH, ratio carbone-sur-azote, concentrations en nutriments, concentrations en composés phénoliques, disponibilité en oxygène, carbone organique dissous) et de la diversité microbienne procaryotes en échantillonnant à quatre points dans le temps au cours de l'année 2018 (printemps, début et fin de l'été et automne), dans cinq zones distinctes de la tourbière (incluant les zones ombrotrophes et minérotrophes), sur trois habitats par zone (buttes, platières et dépression) sur trois profondeurs par habitat et (2) à identifier les principaux facteurs environnementaux structurant la diversité microbienne dans le temps et dans l'espace. Par cette approche, nous espérons donc apporter un éclairage nouveau sur les déterminants de la dynamique des communautés microbiennes au sein d'une tourbière.



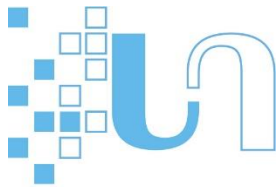
Disentangling the role of environmental heterogeneity in shaping the diversity and composition of microbial communities in a mountain peatland.

(In prep)

V.1. INTRODUCTION

Peatlands are wetlands whose singular functioning alters the dynamics of decomposition of plant material. As a result, organic matter has accumulated there for several thousand years during the present interglacial period, in some sites more than 10 m thick, currently making these ecosystems one of the most important carbon reservoirs on Earth (Clymo *et al.*, 1998, Turunen *et al.*, 2002). Natural peatlands therefore act as a carbon sink, storing, according to estimates, between 500 Gt and 1105 Gt of C (Yu *et al.*, 2010, Nichols & Peteet, 2019, Ratcliffe *et al.*, 2020), i.e. approximately at least 22% of terrestrial carbon (Leifeld & Menichetti, 2018), whereas they only represent 3% of terrestrial surfaces (Yu *et al.*, 2010). The storage of carbon in peatlands stems from an imbalance between primary productivity and microbial decomposition as a result of an interplay between abiotic environment (hydrology, groundwater chemistry, climate) and biotic factors (Sphagnum-produced microbial inhibitory compounds, recalcitrant Sphagnum material) leading to slowing down the decompositional processes of organic material (Clymo, 1984). The largest peat deposits are concentrated in the North hemisphere in continental boreal and sub-arctic regions (Northern Europe, North America and South East Asia) representing about 87% of the world's peatlands (Vitt, 2013). Peatlands are areas with or without vegetation with thick (>30 cm to 40 cm) organic material accumulating at the surface. They cover in fact different typologies classified according to two main hydrogenetic types: i) ombrogenous (or ombrothropic) that are fed with water and nutrients only by precipitation or ii) geogenous (or minerotrophic) that are in addition fed by mineral-rich telluric waters (Joosten & Clarke, 2002). Further ecological gradients and trophic status distinguished bogs, that are nutrient poor, oligotrophic, and acidic, from fens that have generally substantial nutrient input and are less acidic (pH>5.5) (Wheeler & Proctor, 2000).

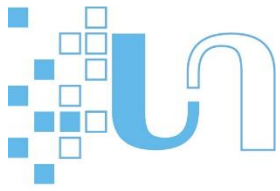
Regarding ecosystem functioning, a higher organic matter accumulation capacity, total amount of carbon stored and total storage capacity in the bogs (Sjors, 1981, Armentano & Menges, 1986, Thormann *et al.*, 1999) further suggest different ecological processes above (plant biomass growth) and below (microbial decomposition rate) ground in each peatlands types. Thus, Moorre *et al.* study (2007) which investigated



the rate of litter decomposition in a bog site and a fen site showed that fens exhibit the fastest decomposition rate at the surface, the difference being chiefly linked to the water table position. In addition, bogs and fens are also different regarding CH₄ greenhouse gas emissions, the latter being a more significant emitter (Laine & Vasander, 1996, Turetsky *et al.*, 2014, Abdalla *et al.*, 2016).

Microbial communities are key elements of ecosystems functioning. In soils, they are central components in the fundamental process of C and N cycling by contributing significantly to the decomposition and mineralization of organic matter, its stabilization and to the release of nutrients for plant growth (McGuire & Treseder, 2010, Jansson & Hofmockel, 2020). Recent studies (Glassman *et al.*, 2018) importantly have shown that the composition of the microbial communities has a significant impact on litter decomposition rates, in addition to the already recognized effect of climate and litter quality. This finding is critical because it demonstrates that considering microbial diversity should lead to a better prediction of ecosystem responses to climate change. It is thus of importance in getting a better knowledge of soil microbial diversity and to decipher which are the drivers that govern their composition. Within the current preoccupation of climate change and given the leverage effect that peatlands may have on either carbon storage or greenhouse gas release it is of relevance to better characterize the extent of microbial diversity and its drivers in these ecosystems. Several studies have explored microbial diversity in Northern peatlands, most of them have considered a unique peatland type either bog (Morales *et al.*, 2006, Pankratov *et al.*, 2011, Tsitko *et al.*, 2014) or fens (Cadillo-Quiroz *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2019, Emsens *et al.*, 2020), less compared fen versus bog types (Kim *et al.*, 2008, Lin *et al.*, 2012, Ivanova *et al.*, 2020) while, to our knowledge, very few attempts have been made to encompass the spatio-temporal environmental heterogeneity within a unique system. The case of mixed peatlands, i.e. peatlands that exhibit a mix of ombrotrophic and minerotrophic zones over short distances, are in this respect the models of choice for studying the effect of key ecological gradients that make peatland environmental heterogeneity. In addition, it is worthy to note that few studies have addressed whether the effect of seasonality in peatlands may imprint patterns of microbial diversity. Because it is of importance to gain into a better resolution of the drivers of microbial diversity in peatlands the main goal of our study was to decompose, in a unique peatland system, the different sources of environmental variations that operate in such ecosystems. In addition to gain into a better knowledge of microbial peatland diversity and the underlying processes handled by microorganisms, such information is also of importance to help in the design of experiments aiming at obtaining a more accurate estimation of microbial diversity.

In this study, we aimed to characterize the internal environmental and microbial diversity (herein prokaryote diversity) at fine scales throughout an entire mountain peatland and to evaluate to which extant environmental heterogeneity shapes the diversity and composition of microbial community.



Environmental and microbial diversity was quantified through an exhaustive and unique sampling carried out in space and time and encompassing the main sources of variation in a mixed mountain peatland namely: seasons, depth, habitats (hummock, lawn and hollow) and hydrogenetic types (ombrothropic and minerotrophic). Environmental heterogeneity was assessed by selecting seven key variables identified as among the main drivers of microbial diversity in peatlands. These variables are presented in detail in Table 1, along with their expected effects on microbial diversity.

V.2. MATERIALS AND METHODS

Study Site Description and Sample Collection.

Sampling was carried out at the Bernadouze peatland (42.80247 N, 1.42333 E), located at an altitude of 1344 m in the Eastern part of the French Pyrenees. The peatland covers an area of 4.7 ha and belongs to a 1.4 km² watershed on limestone rocks. Due to its size and its altitude, Bernadouze is representative of the type of peatlands identified in southwestern Europe alpine and montane areas. The peatland of Bernadouze has a postglacial origin and has developed from a lake 10 000 years ago, reaching today a peat accumulation depth of 2 m on average (Jalut *et al.*, 1982, Reille, 1990). The peatland is under oceanic climatic influence though weather conditions can be locally highly contrasted due to the specific mountainous topography. For the years 2015 to 2018, the mean annual temperature was 7.9 ± 0.3 °C and the mean annual precipitation was 1797 ± 265 mm (Rosset *et al.*, 2020). From mid-October to mid-May, negative temperatures and snow events are regularly recorded at Bernadouze. The watershed is mainly dominated by Beech forest while the vegetation on the peatland is mainly composed of species characteristic of minerotrophic peatlands such as *Carex demissa* (Cyperaceae) and *Equisetum fluviatile* (Equisetaceae). However, some ombrotrophic species such as *Sphagnum palustre* and *Sphagnum capillifolium* (Sphagnaceae) occur on the southern part of the site (**Figure V.1**).

The peatland is a natural reserve since 1983, a Natura 2000 site since 2007 and is one of the four peatlands monitored by the French National Observation Service for Peatlands (<https://www.sno-tourbieres.cnrs.fr>). To provide context to our study, we gathered data on the mean water level fluctuation for our sampling period (from June to October 2018, see details below) collected from 10 piezometers distributed across the entire peatland. We also gathered measures of CO₂ fluxes collected from automated soil respiration chambers from the peat surface. Further details on data collection can be found in (Rosset *et al.*, 2020). All

data were kindly provided by L. Gandois and T. Rosset from the Laboratory for Functional Ecology and Environment (ECOLAB) from the University of Toulouse. The first day of our sampling, we also placed one Tinytag® miniature data loggers with temperature probes at the subsurface (-10 cm) and one at 1 meter depth at three distinct locations in the peatland (**Figure V.1**) in order to monitor temperature fluctuations throughout our sampling period. The dataloggers were let in field for one year.

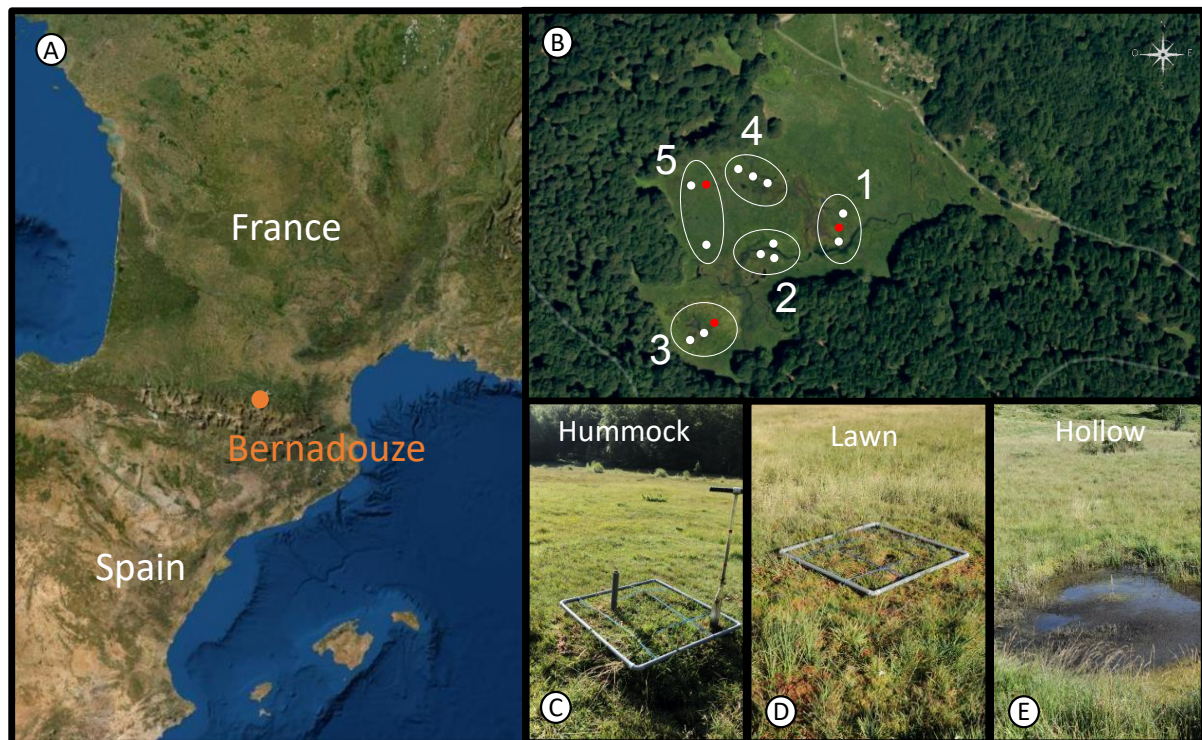
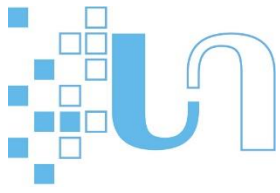


Figure V.1. (A) Location of the peatland on the French Pyrenees and (B) location of five zones (white ellipses) with the three sampled sites per zone marked with white dots and red dots.

The red dots indicating the sites where the Tinytag® miniature data loggers were placed. For each zone, we selected one site on a hummock (C), one on a lawn (D) and one on a hollow (E). Each site was sampled at three depth (top, mid-depth and bottom) during four campaigns distributed from early June to the end of October 2018.

Four sampling campaigns were carried out in 2018, the 12-13th of June, just after the melt of the last snow patches, the 2-5th of July, the 4-5th of September and the 22-25th of October just before the first snowfalls. At each campaign, five different zones were sampled. These five zones were defined to cover as best as possible the environmental heterogeneity of the peatland. The zones 1 and 2 were distributed

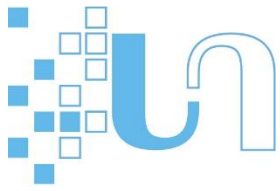


along the main stream draining the peatland with the zone 1 being toward the outlet of the peatland (**Figure V.1**). The zone 3 was located in the southern part of the peatland in the *Sphagnum*-dominated area (**Figure V.1**) while zones 4 and 5 were positioned toward the northern edge of the peatland. For each zone, we selected three sampling sites, one on a hummock, one on a lawn and one on a hollow. For the hummock and lawn, we placed a 1 m² quadrat and collected three cores of one meter depth (triplicate) using a Russian-type peat corer (5 cm × 50 cm). Because our corer was 50 cm length, one core (one replicate) was therefore made of two consecutive coring in order to reach one-meter length (**Figure V.1**). For the hollow, we collected our triplicate at 20 to 30 cm from the edge, keeping one meter distance between each coring. Between each coring, the corer was cleaned with Milli-Q water. For each replicate, we collected three samples of 15 cm at three different depth: subsurface (just below *Sphagnum* layer corresponding to the top of the first 50 cm core), middle (approximately near the zone of water-table fluctuation, corresponding to the bottom of the first 50 cm core) and at the bottom of core (waterlogged areas, corresponding to the bottom of the second 50 cm core). For each sample of 15 cm, we recorded the peat temperature using a digital soil thermometer and we collected a first subsample of peat in an 5ml tube which was directly transferred in a portable liquid nitrogen container for further molecular analyses. A second subsample was collected with a round cookie cutter and place in a small plastic bag to measure the Water Filled Pore Space (WFPS) and a third subsample was also taken from which we extracted the pore water to measure the pH. All the aforementioned manipulations were made directly in the field few minutes after the coring. In each site, we also installed a piezometer in place of the hole let by our first coring and the water-table level was recorded the day after. Finally, for each site and for each depth, we pooled and mixed the triplicate into a plastic bag for further biogeochemical analyses. In total, 180 samples (4 campaigns × 5 zones × 3 habitats × 3 depths) were brought back to laboratory.

Biogeochemical parameters measurement.

To measure the WFPS, the dedicated subsample was first weighted (wet weight) and subsequently dried in the oven at 80°C for 48 h to obtain the dry weight. Peat water content was calculated by subtracting the wet weight with the dry weight and divided by the wet weight. Soil bulk density (g/cm³) was calculated by divided the dry weight by the volume of the subsample. WFPS was thus determined by subtracting peat water content with soil bulk density multiplied by 100 and divided by 1- soil bulk density/1.5 (Linn & Doran, 1984).

For each sample, we carried out a peat water extraction using a peat/water ratio (w/v) of 1/5.

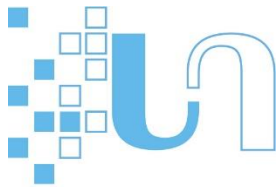


After agitation during 2h at 150 rpm, the homogenates were pre-filtered using electric air pump on nylon filtration fabric Nitex Ø 80 µm, centrifuged during 20 min at 4000 rpm and filtered on filters GF/A and GF/F and followed by two last filtrations on 0.45 µm and 0.2 µm. Dissolved Organic Carbon (DOC) and major ions were measured from the filtered water using TOC-5000A analyzer (Shimadzu, Japan) after acidification to pH 2. Major cations and anions (NO_2^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , NH_4^+ , PO_4^{3-}) were quantified using High Performance Ion Chromatography (Dionex Ics-5000+ (Anions); Dionex DX-120 (Cations)). Total organic carbon and total organic nitrogen were measured by elementary analyzer analyzed (Flash 2000 ThermoFisher).

Free phenol was also quantified from filtered water. In brief, 30 g of peat was added to 150 ml of Milli-Q water quality ultra-pure and agitated during 1h. Two-hundred µl of this homogenate was mixed to 10 µl of 2M Folin-Ciocalteu reagent and 30 µl of Na_2CO_3 (100 g/L) into 96 microplates well. The absorbance wave length was measured after at 765 nm an incubation of 30 min at 40°C using Synergy HTX Multi-Mode Reader machine. The standard curve was performed using concentrations of 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 mg/l of gallic acid. Phenolic content is then expressed as gallic acid equivalents, mg/g of peat dry weight.

DNA extraction, PCR amplification and sequencing. In the laboratory, the 5 ml triplicate was homogenized and crushed in porcelain bowls under liquid nitrogen. DNA extraction was performed using DNeasy PowerSoil kit following the manufacturer's instructions (MO BIO Laboratories, UK). The 16 S library was constructed according to Lluch *et al.* (2015) with 515F (5'- GTGYCAGCMGCCGCGTA-3') and 928R (5'- CCCCYCAATTCMTTTRAGT-3') primers and the following PCR amplification conditions: 95°C for 10 min, followed by 35 cycles of 95°C for 45 s, 54°C for 45 s and 72°C for 1 min, after which a final elongation step at 10°C for 10 min was performed. Sequencing was performed on a Illumina MiSeq Desktop Sequencer (Illumina Inc., CA, US) using paired-end sequencing with MiSeq Reagent Kits v3 (Illumina Inc., CA, US) on the Genotoul platform (Auzeville, France).

Sequence processing, taxonomic classification. The open-source software QIIME 2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) was used for sequence read analysis of the bacterial and archaeal 16S rRNA gene sequence (Boylen *et al.*, 2018). Bacterial and archaeal primer-specific trained Naive Bayes taxonomic classifiers₂, using the SILVA 132 release, were used to classify the representative amplicon sequence variants (ASV) sequences. To account for variable sequencing depth, all the following analyses of diversity



detailed below were calculated using a rarefied matrix subsampled to 20826 reads per sample representing 22500 ASVs.

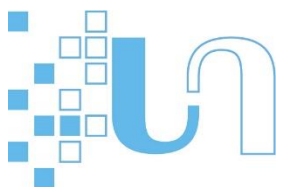


Table V-1. Overview of the environmental variables considered in this study.

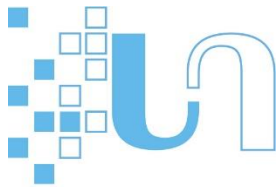
For each variable, the abbreviation, units, range and ecological relevance is given.

Variables (Abbreviation)	Range [min-max] (units)	Ecological relevance
Temperature (TEMP)	[7.6 - 19.87] (°C)	Temperature modulates microbial abundance, metabolism, enzyme activity and community structure.
Water-Filled Pore Space (WFPS)	[58.84 – 100] (%)	WFPS is a proxy of the oxygen gradient. Oxygen concentration plays a major role in shaping microbial communities segregating aerobic and anaerobic assemblages.
Distance to the water table (DWT)	[-92.50 – 50.50] (cm)	Distance to the water table is also a proxy of the oxygen gradient and among the predominant abiotic factors that structure the composition of microbial communities (Wang <i>et al.</i> , 2019).
pH (PH)	[4.17 – 7.20]	pH is often considered as one of the most structuring parameters of microbial assemblages in peatland (Pankratov <i>et al.</i> , 2008). In peatland, pH is also regulated by water-soluble phenolic compounds released by living <i>Sphagnum</i> which tend to acidify the environment (Clymo, 1984, Rasmussen <i>et al.</i> , 1995). Acidification induces a decrease in bacterial biomass and diversity (Rousk <i>et al.</i> , 2010).
NO ₂ [*]	[0 - 0.0072] (mg/L)	High concentrations of inorganic N increase the activity of extracellular enzymes involved in C acquisition and consequently increases degradation. In peatlands, McAndrew & Malhi (1992) showed that inorganic N inputs can act indirectly on microbial populations through changes in pH and the ionic strength of soil,
NO ₃ [*]	[0 - 0.0473] (mg/L)	



SO_4^{2-*}	[0.0066 - 8.5761] (mg/L)	and through stimulation of plant growth. The type of anaerobic respiration will depend on the availability of these external electron acceptors (Rydin <i>et al.</i> , 2006, Rydin & Jeglum, 2015).
NH_4^{+*}	[0 - 0.1915] (mg/L)	
PO_4^{3-*}	[0 - 0.0158] (mg/L)	
Free phenol (FPHE)	[0.00045 - 0.00944] (mg GA / g)	Water-soluble phenolic compounds released by living <i>Sphagnum</i> may have an immediate impact on decomposition rates by inhibiting microbial activity, and therefore favoring peat accumulation (Verhoeven & Toth, 1995).
C:N ratio (CN)	[12.66 - 28.24] (unitless)	Carbon-to-nitrogen ratio is an indicator for peatland degradation and one of the main factors regulating critical microbial processes such as nutrient mineralization and immobilization (Leifeld <i>et al.</i> , 2020).
Dissolved Organic Carbon (DOC)	[0.49 - 18.47] (mg/L)	DOC can represent an important source of energy-rich C substrates for microorganisms (Lew <i>et al.</i> , 2019). In other studies, DOC is considered as proxy of plant and microbial activity, the main sources of DOC are attributed to litter leachates, root exudates and microbial degradation products (Piccolo <i>et al.</i> , 1996).

* Due to the collinearity between the concentrations of the cations and anions, we performed a Principal Component Analyses (PCA) to reduce the dimensionality of the data and kept the first axes, explaining 58% of the total variance, as a composite variable expressing variations in nutrient concentrations (Abbreviation: NUT).



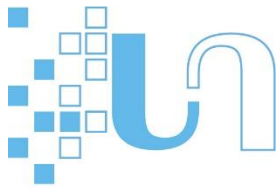
Statistical analysis.

Our first set of analyses aimed to quantify the environmental heterogeneity of the peatland. Prior to the analyses, we performed a Principal Component Analyses (PCA) on the cation and anion dataset (NO_2 , NO_3 , SO_4^{2-} , NH_4^+ , PO_4^{3-}) and kept the first axes, explaining 58% of the total variance, as a composite variable expressing variations in nutrient concentrations. The main contributors of the axes were NH_4^+ (89%), SO_4^{2-} (75%) and PO_4^{3-} (60%). For each variable separately (i.e. Temperature, WFPS, pH, nutrient, free phenol, C:N and DOC), we performed a analyses of variance (ANOVA) using campaigns, zones, microhabitats and depth as predictors to identify the main source of variation. All possible two-way interactions were also included but triple interactions were excluded to avoid complex outcome interpretations. However, preliminary tests did not reveal any specific effects of the triple interactions. When factors were significant, post hoc tests (Tukey's HSD test) were performed to identify group levels that were significantly different from each other. A PCA was also conducted in order to visually discriminate sites according to their environmental characteristics. Prior to this analysis, all variables were standardized to Z-scores (mean = 0, SD = 1) to control for differences in variance and units of measurement among variables. We further created a dissimilarity matrix using all standardized variables to quantify the overall differences in environmental characteristics between pairs of sites ($N=180$). Dissimilarities were calculated as Euclidean distances. We further used a nonparametric permutational multivariate analysis of variance (PerMANOVA; Anderson, 2001) to identify the main source of variation in environmental dissimilarity in the same way as specified above. PerMANOVA was performed using permutation tests with 9,999 iterations. When factors were significant, Pairwise PerMANOVA post hoc tests were performed to identify group levels that were significantly different from each other (Hervé, 2020).

Our second set of analyses aimed to quantify the variation in microbial diversity (Alpha diversity) and composition (Beta diversity) between the 180 sites. We first quantified Alpha diversity in each site using ASV richness and the Simpson evenness E calculated as followed:

$$E = \frac{1}{S(\sum_{i=1}^S p_i^2)}$$

where S is the ASV richness and p_i is the relative abundance of ASV i ($i = 1, 2, \dots, S$). Note the numerator corresponds to the Inverse Simpson index. As specified above for the environmental variables, we performed ANOVA using campaigns, zones, microhabitats and depth and all two-ways interactions as predictors to identify the main source of variation in Alpha diversity. Beta diversity was quantified with Bray-Curtis dissimilarity to account for relative abundance of the ASVs. As specified for the environmental



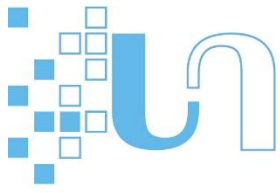
dissimilarity, we performed PerMANOVA for each beta measure to identify the main source of variation. Beta diversity matrices were visualized using nonmetric multidimensional scaling ordinations (NMDS). Finally, we derived a measure of local contributions to beta diversity (LCBD) for each site using the beta partitioning proposed by Legendre & De Cáceres (2013). LCBDs quantifies the ecological uniqueness of a site compared with the other sites sampled in a region. Unlike traditional beta diversity indices, LCBDs generated one value per site and thus can be used in classic linear multiple regressions as for Alpha diversity metrics (See below). LCBDs were calculated as followed:

$$LCBD = \frac{diag(G)}{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n D_{ij}^2}$$

where n is number the samples, D_{ij} is the Bray-Curtis dissimilarity matrix, and G is centred matrix $[-0.5D_{ij}^2]$ (See further details in Legendre & De Cáceres (2013)). We also computed an ANOVA on LCBD to identify the main source of variation.

Our third and final set of analyses aimed to identify the main drivers of ASV diversity and composition. We first implemented a Procrustes analyses to determine the overall degree of concordance between dissimilarity in environmental characteristics between sites and dissimilarity in ASV composition using Bray-Curtis (Peres-Neto & Jackson, 2001). In the Procrustes analysis, a pair of data matrices (i.e. the scores of the sites from two ordinations generated with environmental dissimilarity and dissimilarity in species composition) is compared by using a rotational-fit algorithm that minimizes the sum of squared residuals between the two matrices. Concordance is then quantified with a correlation index in the symmetric Procrustes rotation. P-values were evaluated with 9999 Monte Carlo permutation tests.

We modelled ASV richness, Simpson evenness and LCBD using linear mixed models (LMM) with environmental variables as fixed factors and sites as a random effect to account for temporal pseudo-replications. Prior to these analyses, we investigated all univariate relationships between environmental variables and our three metrics. Because a potential humped-shaped relationship between pH and ASV richness was detected, we added the second-order polynomial terms pH^2 in the model to account for non-linear relationships. We further estimated the pH_{max} at which the ASV richness is expected to be maximum as $-S_1/2S_2$ with S_1 the slope estimated for pH and S_2 the slope estimated for pH^2 . The distance to the water table was added to the models as a proxy of the oxygen gradient, distinguishing therefore the oxic and



anoxic horizons in the peat cores. Multicollinearity was not a major issue in our analyses as predictor variables were not strongly collinear and all variance inflation factors (VIFs) were < 3 , sample sizes were large ($N = 180$) and the residual variances for most models were relatively low (Morrissey & Ruxton, 2018). Residuals of the models were surveyed in order to detect deviations from normality and homoscedasticity and to identify outliers. We employed an information theoretic approach to capture the best set of variables explaining our diversity metrics by fitting all possible models and calculating Akaike's information criterion (AICc) corrected for small sample size for each model; the best model being the one with the smallest AICc (Burnham & Anderson, 2002). However, all models with a ΔAICc value < 2 (the difference between each model's AICc and the lowest AICc) were considered as receiving equal statistical support (Burnham & Anderson, 2002). As a measure of variable importance, we used the standardized regression coefficients of each variable included in the best model. In case of multiple best models, we calculated model-averaged standardized regression coefficients using the Akaike weights of each model (Burnham & Anderson, 2002). For all standardized regression coefficients, we calculated their associated 95% confidence intervals and considered as significant predictors those with a confidence interval not overlapping zero.

Statistical analyses were implemented within the R programming environment (R Development Core Team, 2019) using the packages *vegan* (Oksanen *et al.*, 2013), *nlme* (Pinheiro *et al.*, 2012), *BAT* (Cardoso *et al.*, 2015), *MuMIn* (Barton 2020) and *RVAideMemoire* (Hervé & Hervé, 2020)

V.3. RESULTS

Overall, the study period captured part of the seasonality of the ecosystem with a growing season from June to August characterized by an increase in both temperature (on surface and at 1 meter depth) and respiration, followed by a decrease in both parameters (**Figure V.2**). More precisely, daily surface temperature on Bernadouze showed strong fluctuations over the study period, varying from 12.33 °C in early June to 5.75 °C in the end of October with a maximum of 20.88 °C reached the first of August (**Figure V.2A**). As expected, daily temperature at 1 meter depth was lower than surface temperature and showed a smoother profile and lower variation, from 8.26 °C to 10.48 °C with a maximum of 13.57 °C reached the 7th of September (**Figure V.2B**). Regarding the respiration (CO₂ fluxes), we also observed higher values in the end of June and end of July and a continuous decrease from mid-August to early November (**Figure V.2B**). The fluctuations of the water table level exhibited a more complex profile throughout our study period, with a succession of high and low levels, certainly triggered by precipitations (**Figure V.2D**, see Rosset *et al.*, 2020).

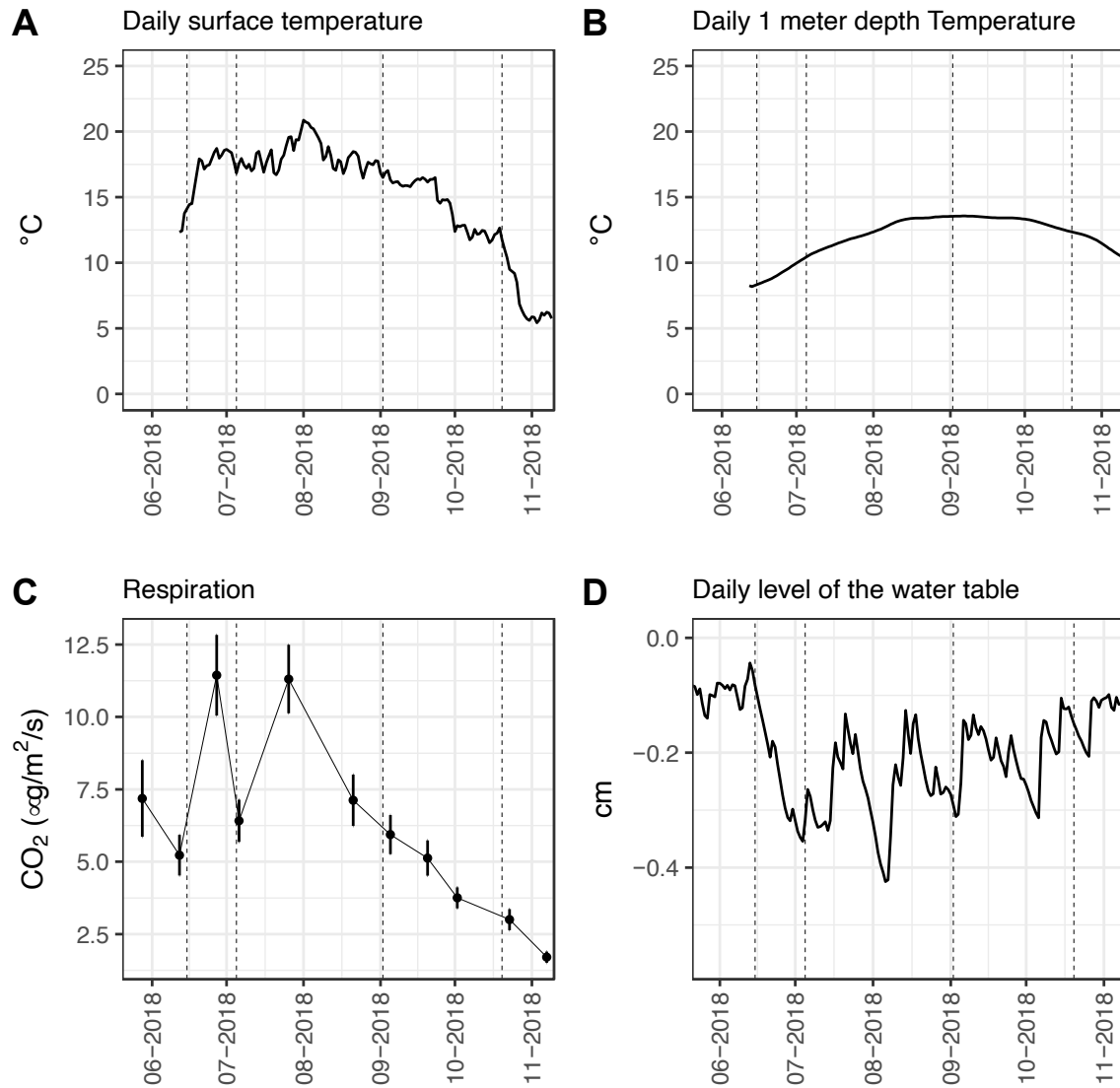


Figure V.2. Fluctuations of (A) daily surface temperature and (B) daily temperature at 1 meter depth [dark line = average of three sites (See Figure V.1); grey envelope = standard deviation], (C) respiration (CO_2 fluxes) (dots = average of 5 measures; error bars = standard errors) and daily level of the water table over our study period (dark line = average of 10 piezometers; grey envelope = standard deviation).

Dotted vertical lines indicated the first day of the four sampling campaigns of 2018 i.e. the 12th of June, the 2nd of July, the 4th of September and the 22nd of October.

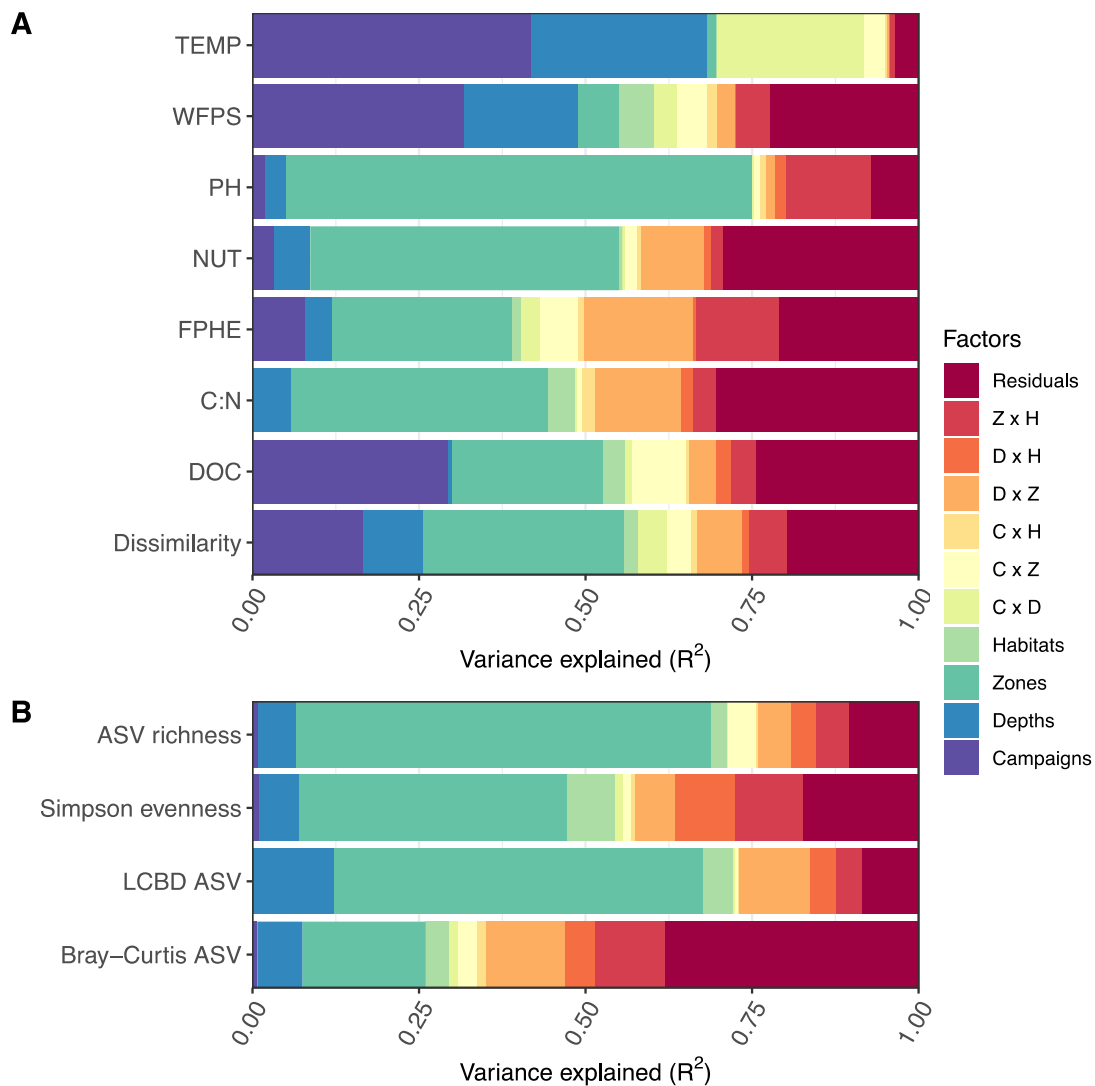


Figure V.3. Results of the analyses of variance testing the effect of campaigns, zones, habitats and depth and all possible two-way interactions on (A) the seven environmental variables and (B) diversity metrics.

All analyses were performed with ANOVAs except for distance matrices i.e. environmental dissimilarity and Bray-Curtis ASV for which a PerMANOVA was performed. The variance explained (R^2) by the factors and their two-ways interactions is given for each variable as well as the residual variance. TEMP = Temperature, WFPS = Water-filled pore space, NUT = Nutrients (PC axes), FPHE = concentrations of free phenols, C:N = carbon-to-nitrogen ratio, DOC = Dissolved Organic Carbon, Dissimilarity = Environmental dissimilarity computed as Euclidean distance, LCBD = Local Contribution to Beta Diversity calculated on Bray-Curtis dissimilarity.

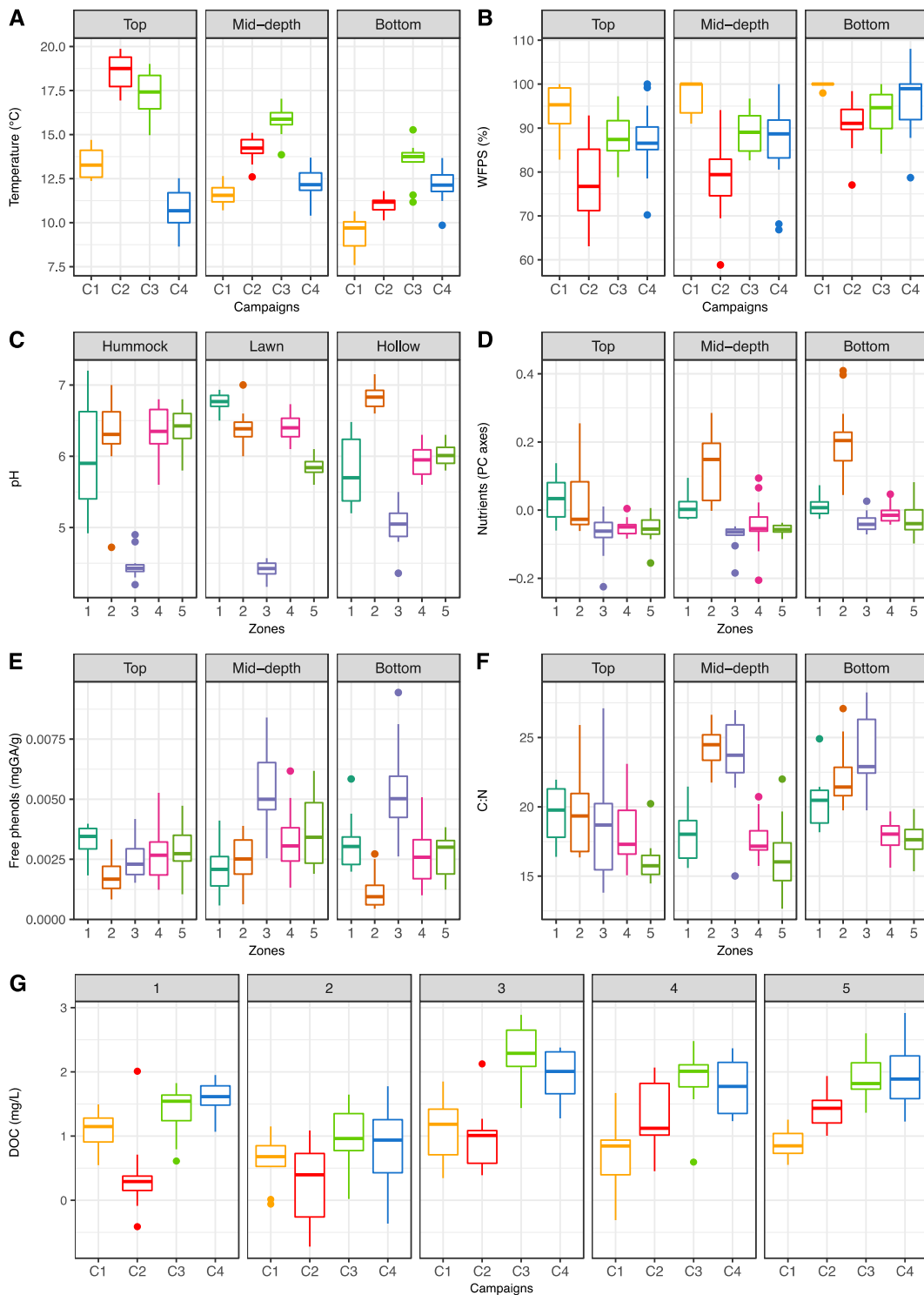
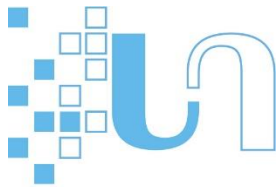


Figure V.4. Main sources of variation for the seven environmental variables considered in this study.

Only the most important factors identified in **Figure V.3** were represented. WFPS = Water-filled pore space,

C:N = Carbon-to-Nitrogen ratio, DOC = Dissolved Organic Carbon.

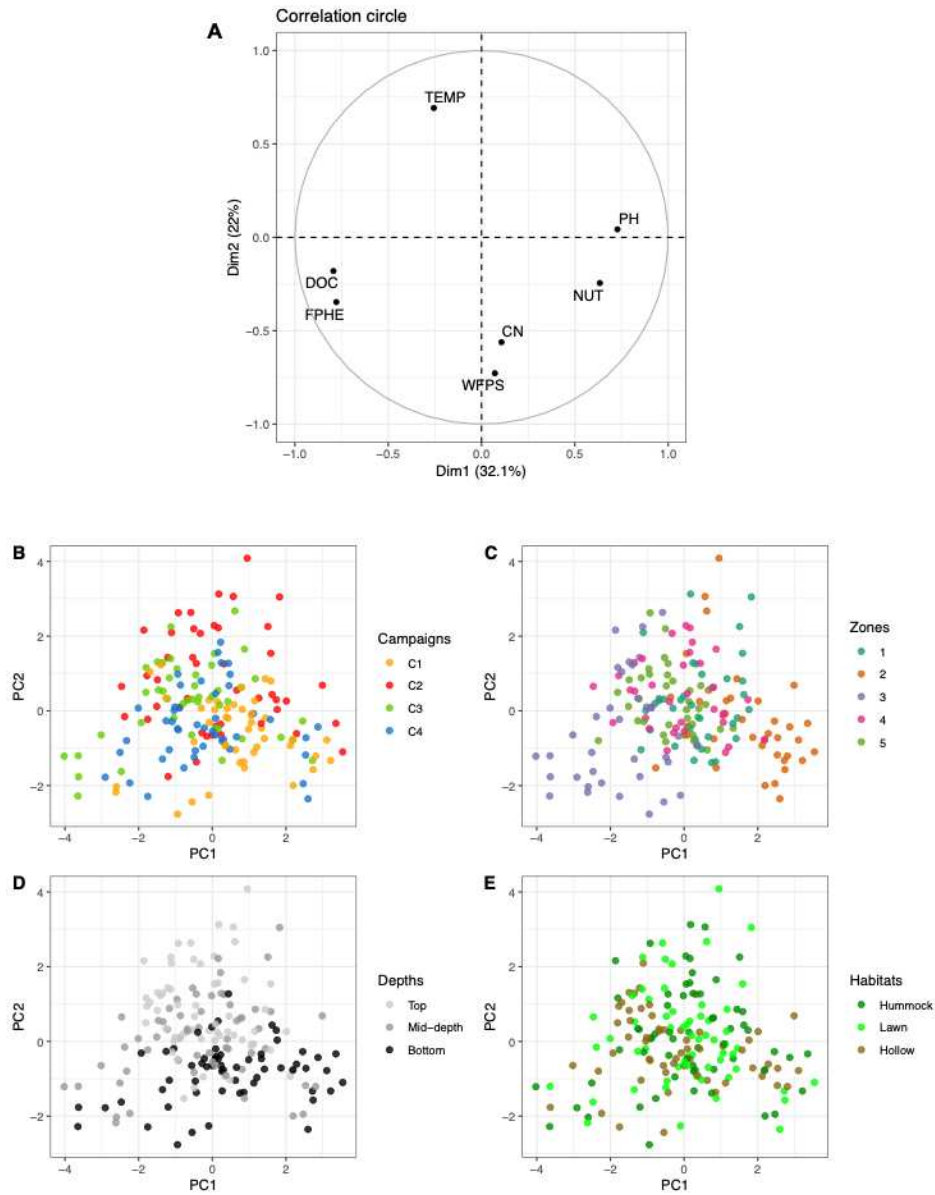
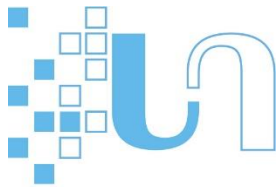


Figure V.5. Results of the Principal Component Analyses (PCA) conducted on the seven environmental variables considered in this study.

(A) Correlation circles with the projection of the seven variables on the first two principal components explaining together 54.1% of the total variance and (B-E) PCA ordination of the 180 sites with colored dots highlighting, (B) campaigns, (C) Zones, (D) depths and (E) habitats.

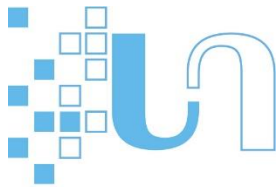


Temporal and spatial environmental heterogeneity

As expected, variations in temperature and WFPS were mainly explained by campaigns (ANOVA; $R^2=42\%$, $P = 0.001$, and 31% , $P = 0.001$ respectively) and in a lesser extent by depth ($R^2=26\%$, $P = 0.001$ and 17% , $P = 0.001$) and the interaction between campaigns and depth ($R^2=22\%$, $P = 0.001$ and 3% , $P = 0.001$) (**Figure V.2**). Temperature was significantly higher in C₂/C₃ and also in surface (Tukey HSD $P < 0.05$) while WFPS was significantly lower in C₂ and in the bottom of cores (Tukey HSD $P < 0.05$, **Figure V.3A**). In contrast, variations in pH, nutrients, free phenols and C:N ratio were mainly explained by zones ($R^2= 70\%$, 46% , 26% and 38% , respectively) with the interaction between zones and depth being the second most important source of variations for nutrients, free phenol and C:N ratio ($R^2= 9\%$, 16% and 13% respectively). Overall, pH and free phenols were respectively lower and higher in Zone 3, higher concentrations of nutrient was detected at Zone 2, and the highest values of C:N ratio were recorded in Zones 2 and 3, specifically at mid-depth (**Figure V.4**). Variation in DOC was mostly explained by campaigns and zones and their interactions ($R^2= 30\%$, $P=0.001$; 22% , $P=0.001$ and 8% , $P=0.001$ respectively) with DOC being higher in C₃ and C₄ and an average lower in Zone 2 (Tukey HSD $P<0.05$, **Figure V.3A** and **Figure V.4**). The PCA performed on the seven standardized environmental variables revealed that, on the first axes (32.1% of the variance explained), sites were mainly discriminated by their values in DOC (contribution to the axes = -0.53), free phenols (-0.52), pH (0.48) and nutrients (0.42), while, on the second axes (22% of the variance explained), mainly WFPS (-0.58), temperature (0.55) and C:N ratio (-0.45) differentiated the sites (**Figure V.5A**). Overall environmental dissimilarity between sites was explained by zones ($R^2= 30\%$, $P=0.001$), campaigns ($R^2= 16\%$, $P=0.001$) and depth ($R^2= 16\%$), the most significant interaction being between zones and depth ($R^2= 6\%$, $P=0.001$) (**Figure V.5B-E**).

Temporal and spatial variation in microbial diversity and composition

A total of 22500 bacterial and archaeal ASVs belonging to 64 taxonomic groups were recovered. Phylas with an abundance $> 1\%$ were as followed: Proteobacteria (18.6%), Acidobacteria (16.7%), Chloroflexi (16.7%), Crenarchaeota (13.5%), Bacteroidetes (7.1%), Planctomycetes (4.7%), Spirochaetes (3.2%), Nitrospirae (2.9%), Euryarchaeota (2.3%), Zixibacteria (1.8%), Nanoarchaeaeota (1.4%) and Thaumarchaeota (1.4%). The first five most abundant phyla were always present and dominant in all samples as the sum of their relative abundance reach up to 80% of the total number of ASVs (**Figure V.6A**). Acidobacteria dominated in Zone 3 samples in almost all habitats and at the three depths while Chloroflexi dominated in Zone 2 samples, mainly at mid-depth and in the bottom of the cores for lawn and hollows. Crenarchaeota were the most important phylum archeal phylum in most samples and was almost as important as Chloroflexi



in the bottom of the cores. The Alphaproteobacteria, the Acidobacteria and the Dehalococcoidia were the most abundant classes among the Proteobacteria, the Acidobacteria and the Chloroflexi respectively (Figure V.6B).

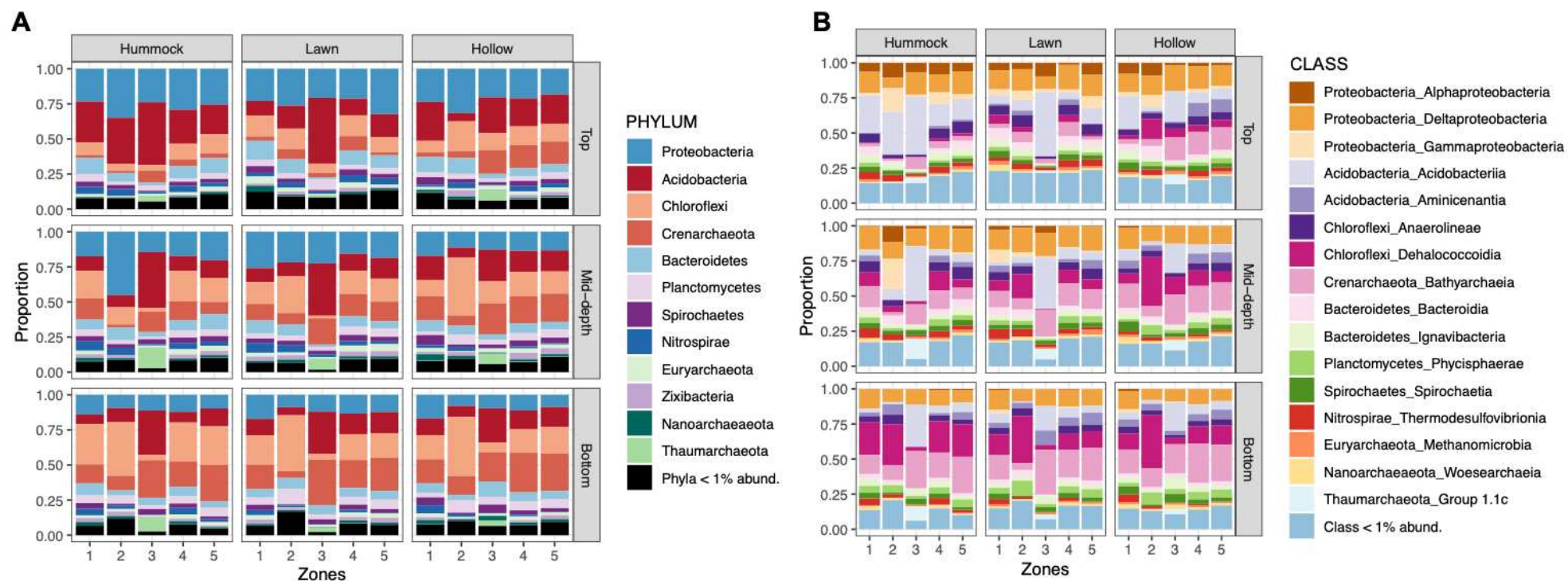
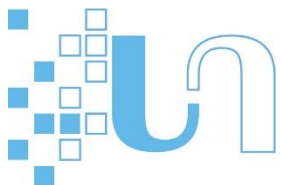
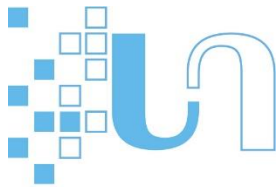


Figure V.6. Barplots of the relative abundance of major phyla (A) and classes (B) present at over 1% of the samples grouped by zones, depth and habitats.



Variations in alpha diversity was strongly determined by the zones ($R^2= 65\%$, $P=0.001$ and 40% , $P=0.001$ for ASV richness and Simpson evenness respectively) with zone 2 and 3 being the least diverse and least even, especially at mid-depth and at the bottom of the cores (Tukey HSD $P<0.05$, **Figure V.3B** and **Figure V.7A-B**). Variations in LCBD was also mainly explained by zone (Tukey HSD $P<0.05$, **Figure V.3B** and **Figure V.7C**). Patterns of beta diversity were more complex with Bray-Curtis dissimilarity being constrained by zones ($R^2= 24\%$, $P=0.001$), the interactions between zones and depth ($R^2= 14\%$, $P=0.001$) and between zones and habitats ($R^2= 10\%$, $P=0.001$) (**Figure V.3B** and **Figure V.8A**).

Drivers of microbial diversity and composition

Procrustes analyses revealed a strong and significant concordance between environmental dissimilarity and dissimilarity in ASV composition (Correlation in the symmetric Procrustes rotation = 0.592, $P < 0.001$) highlighting the fact that sites distant in their environmental characteristics were also distant in their ASV compositions (**Figure V.8B**).

Regarding multi-model inference (**Figure V.9** and **Figure V.10**), pH was found to have a non-monotonic relationship with ASV richness (hump-shaped form) and significant positive relationship (**Figure V.10A**) with Simpson evenness while distance to the water table had significant positive effect on both ASV richness and Simpson evenness (**Figure V.9** and **Figure V.10C**). In a lesser extent, C:N ratio exhibited a lower but still significant negative impact on both diversity metrics (**Figure V.9** and **Figure V.10E**). In contrast, we found that WFPS, distance to the water table, nutrient concentrations and C:N ratio exerted a strong positive control on LCBD while pH and free phenols were found to have a negative effect (**Figure V.9**). Results obtained for the four most dominant phyla showed contrasted outcomes (**Figure V.10B-D-E** and **Figure V.11**). Overall, ASV richness of Acidobacteria was positively and negatively controlled by distance to the water table and pH respectively, while the opposite pattern was detected for both Chloroflexi and Crenarchaeota. In contrast, both distance to the water table and pH had a positive effect on the ASV richness of Proteobacteria. We also identified a low but significant and negative effect of C:N ratio on Acidobacteria, Chloroflexi and Crenarchaeota richness. Interestingly, results for Simpson evenness were not congruent with richness, the former being mainly positively driven by distance to water table and pH and nutrient concentrations for Acidobacteria and Crenarchaeota, negatively driven by distance to water table, nutrient concentrations and C:N ratio for Proteobacteria and positively and negatively driven by distance to water table and nutrient concentrations respectively for Chloroflexi. Patterns for LCBD were very similar to the one obtained with the total (**Figure V.11**).

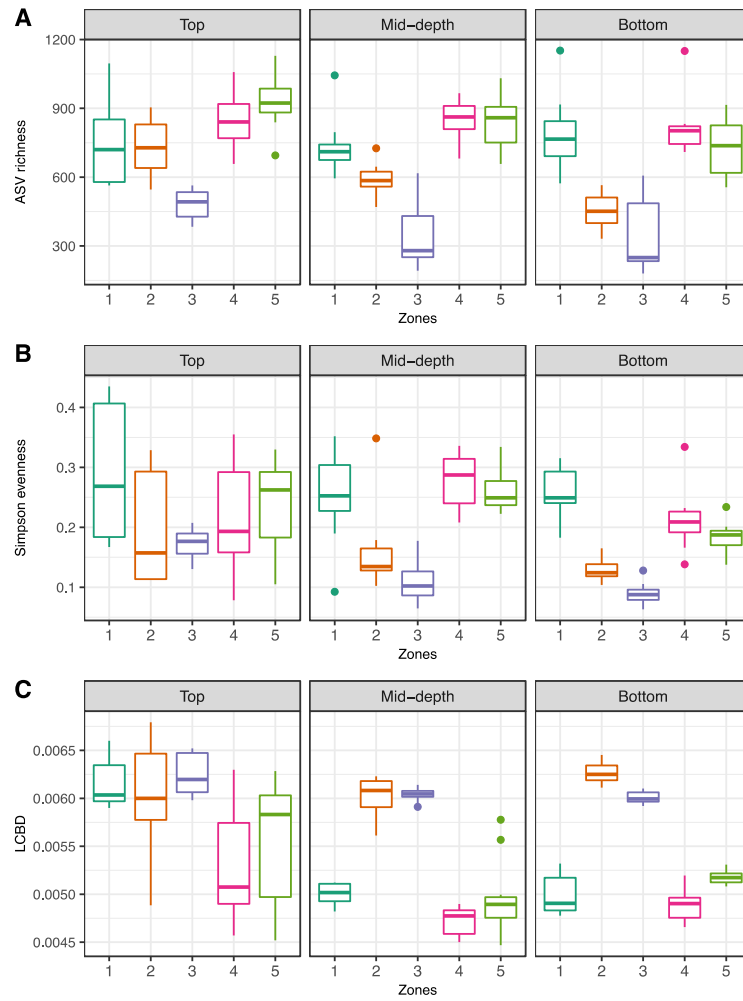
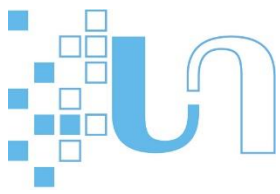


Figure V.7. Main sources of variation for the diversity metrics considered in this study. Only the most important factors identified in Figure V.3 were represented.

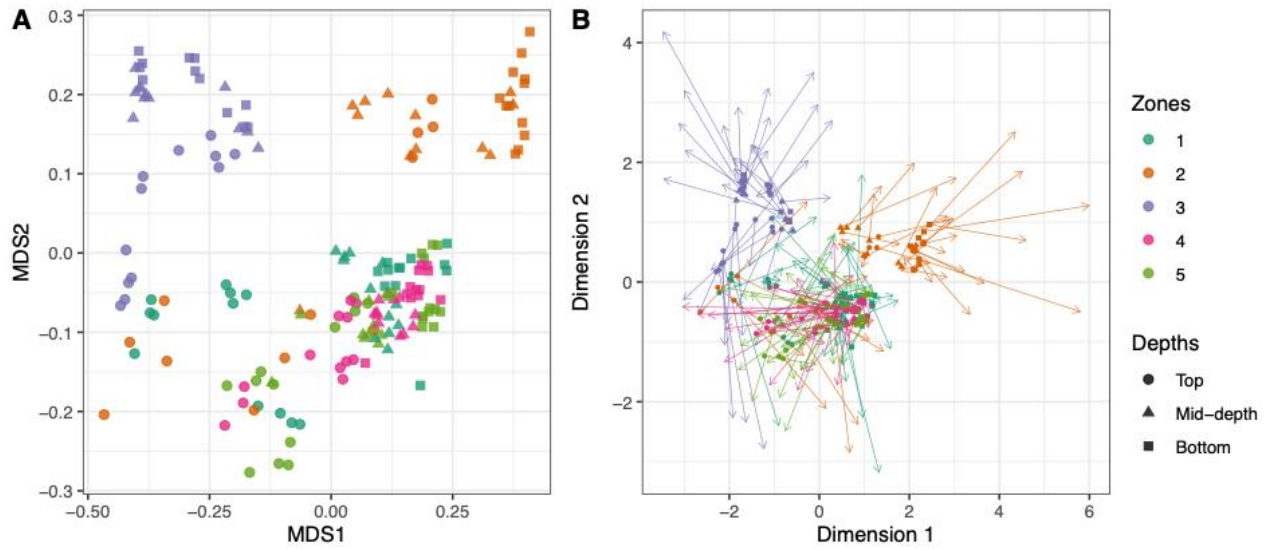


Figure V.8. (A) Two-dimensional ordination solution using non-metric multidimensional scaling (NMDS) based on the Bray-Curtis dissimilarity computed between the 180 samples. Dots indicate samples. The stress value of NMDS was 0.11. **(B)** Procrustes superimposition plots between environment and species composition (9999 permutations), with the input of non-metric multidimensional scaling (NMDS) ordinations calculated from environmental and Bray-Curtis dissimilarity.

The Procrustes correlation coefficient was significantly different from zero at $P < 0.001$. Dots are sites in the environment-based ordination, each arrow connects the position of sites in environment-based ordination to the position of the same site in Bray-Curtis ordination. The arrow length corresponds to the difference in site location between the two ordinations. In both (A) and (B), colors and shape distinguished the zones and the depths respectively, both being the two main sources of variation for Bray-Curtis dissimilarity (See **Figure V.3**).

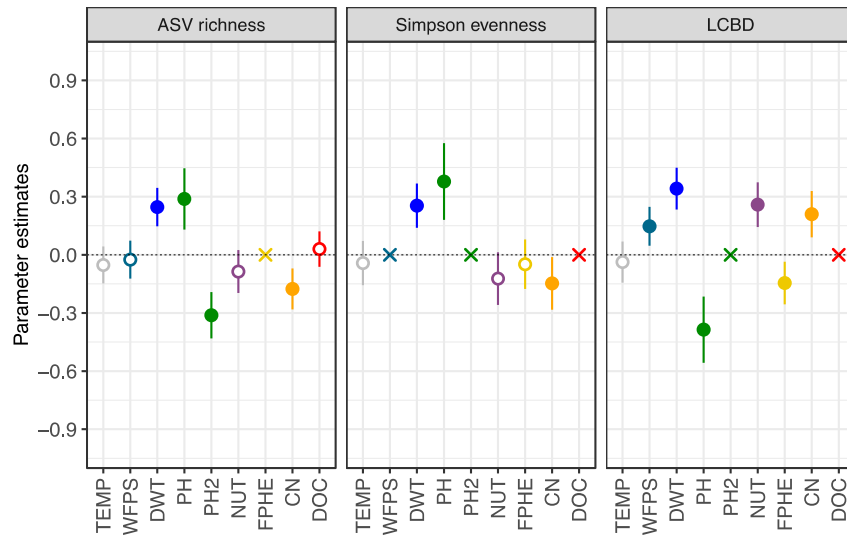


Figure V.9. Results of model-selection procedure for models relating ASV richness, Simpson evenness and Local Contribution to Beta Diversity (LCBD) to environmental variables.

Standardized regression coefficients and associated 95% confidence interval are given. Solid dots indicate variables with a significant effect, white dots indicate without significant effect but included in the best model(s) while crosses designate variables that were excluded from the best model(s) during the model selection procedure. TEMP = Temperature, WFPS = Water-filled pore space, PH₂ = pH², NUT = Nutrients (PC axes), FPHE = concentrations of free phenols, C:N = carbon-to-nitrogen ratio, DOC = Dissolved Organic Carbon.

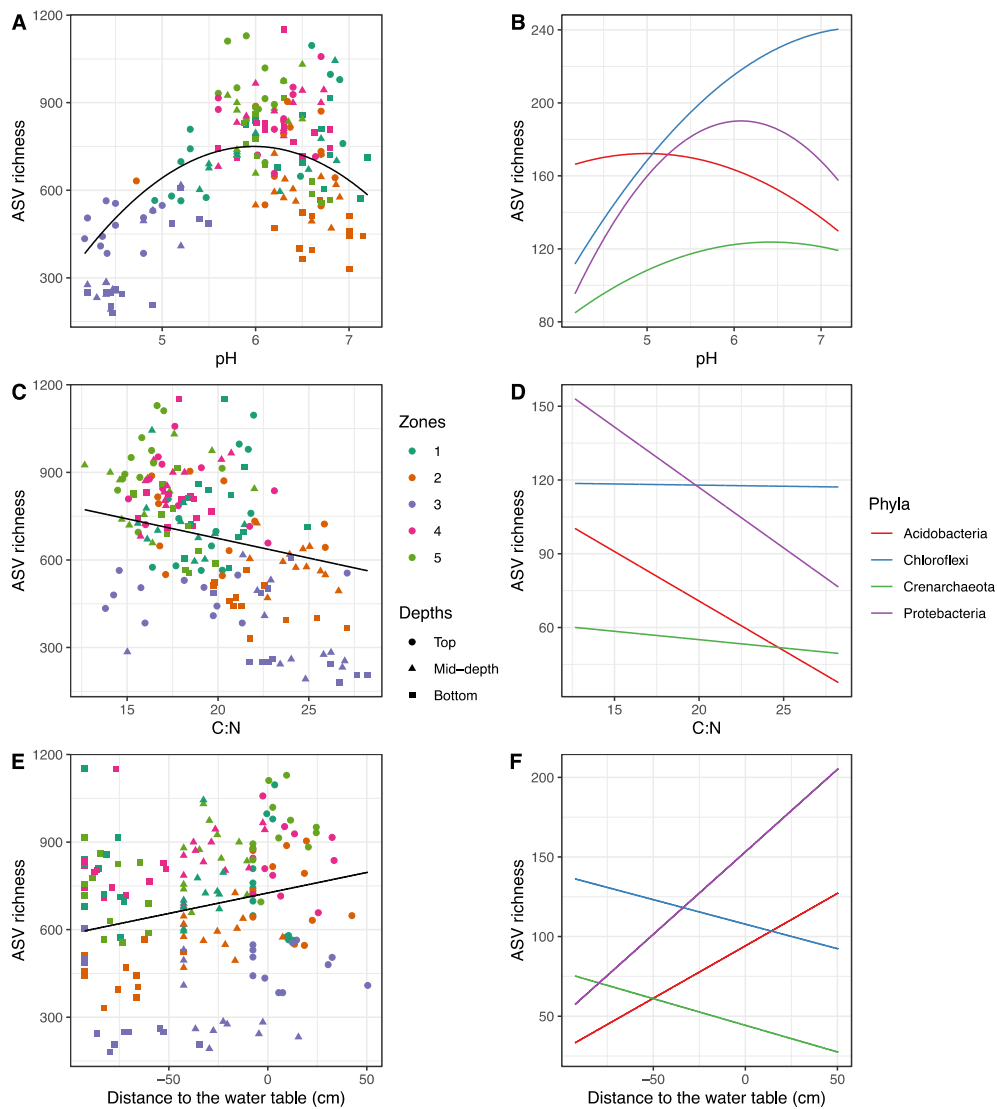


Figure V.10. Selected relationships between environmental variables and ASV richness with the effect of pH (A-B), the effect of C:N (C-D) and distance to the water table (E-F).

The left panels (A, C, and E) show the relationships with all ASVs with colors and shape distinguishing the zones and the depths respectively, both being the two main sources of variation for ASV richness (See **Figure V.3**) and the right panels (B, D and F) show the relationships for the four most abundant phyla (for clarity, only predicted values are presented).

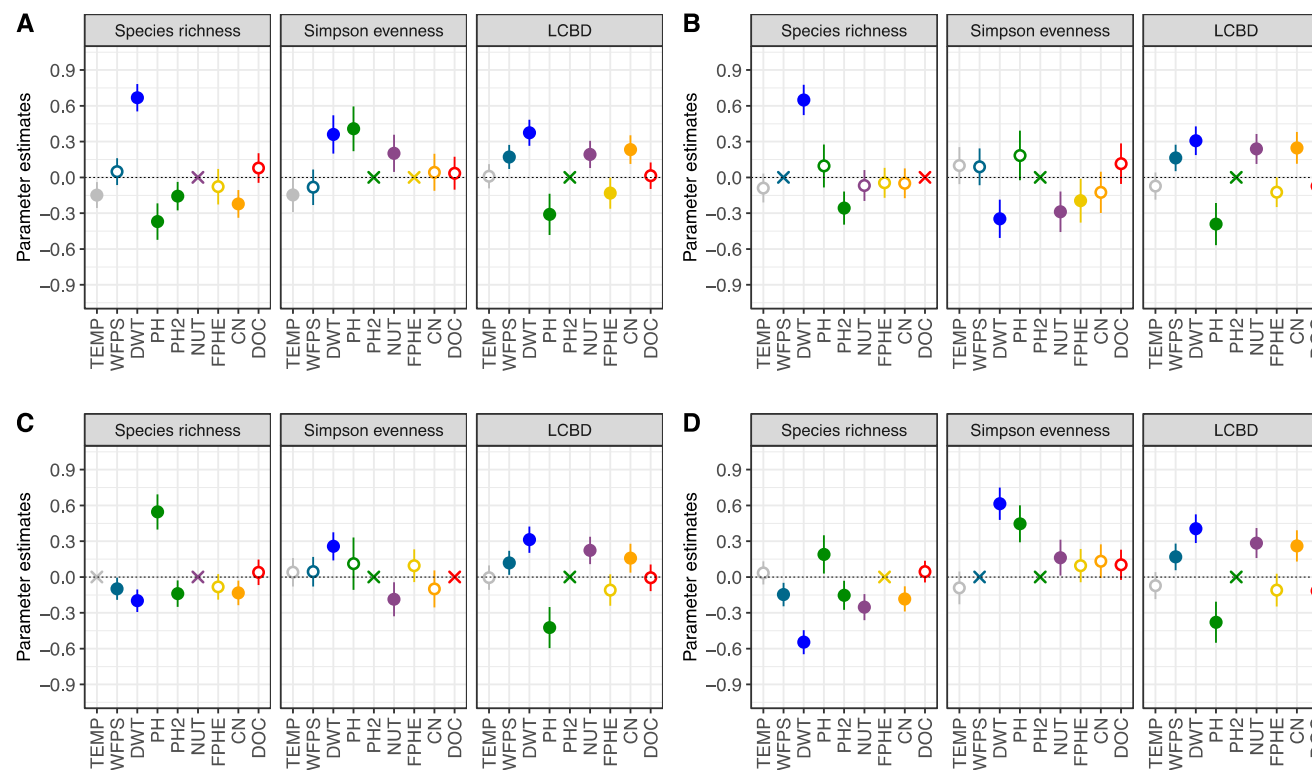
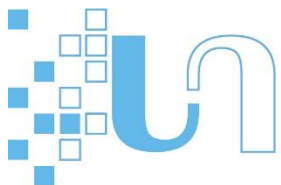
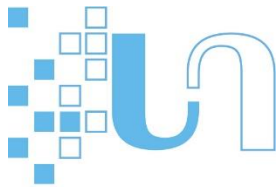


Figure V.11. Results of model-selection procedure for models relating (A) ASV richness, (B) Simpson evenness and (C) Local Contribution to Beta Diversity (LCBD) to environmental variables for (A) Acidobacteria, (B) Proteobacteria, (C) Chloroflexi and (D) Crenarchaeota.

Standardized regression coefficients and associated 95% confidence interval are given. Solid dots indicate variables with a significant effect, white dots indicate without significant effect but included in the best model(s) while crosses designate variables that were excluded from the best model(s) during the model selection procedure.

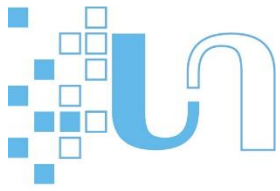
TEMP = Temperature, WFPS = Water-filled pore space, NUT = Nutrients (PC axes), FPHE = concentrations of free phenols, C:N = carbon-to-nitrogen ratio, DOC = Dissolved Organic Carbon.



V.4. DISCUSSION

In the study, we aimed to characterize the spatio-temporal environmental heterogeneity and diversity of the microbial communities within a peatland with a special focus on the effect of key ecological gradients on diversity variation. To our knowledge, our study is one of the few that attempted to identify the ecological determinants of microbial diversity at the scale of a peatland, taking into account most of the potential source of variation in space and time (Mondav *et al.*, 2017, Chroňáková *et al.*, 2019).

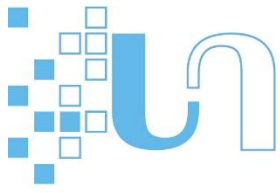
Although Bernadouze covers a very small area (4.7 ha), our study highlighted the presence of an important environmental heterogeneity within the peatland. We found a seasonal pattern, at least over our study period, in peat temperature and DOC corroborating the findings of Rosset *et al.* (2020) who showed that the seasonal variations in DOC concentration at Bernadouze was mostly driven with warmer temperatures suggesting therefore that temperatures could enhanced DOC production by stimulating vegetation and microbial activity. Seasonality was also detected in WFPS. As already documented in other systems, variations in WFPS are mainly triggered by rainfall (e.g. van Groenigen *et al.*, 2005). It is then worth noting that the highest values of WFPS were recorded during our first campaign (early June) which was carried out immediately after the snow melt and under heavy rains while the lowest values were met during our second campaigns (End of June) conducted under hot and sunny conditions (**Figure V.2**). As expected, both temperature and WFPS were also strongly related to depth with temperature being lower and WFPS higher in the deepest horizons of the cores, indicative of the typical waterlogged conditions encountered in most northern peatlands (Rydin *et al.*, 2013, Lin *et al.*, 2014). In contrast, we did not detect any specific seasonality in the remaining variables namely pH, Nutrients, free phenols concentrations and C:N ratio but all exhibited strong spatial structures (**Figure V.3**, **Figure V.4** and **Figure V.5**). For instance, the *Sphagnum*-dominated zone 3 correlated with lower pH (≈ 4), higher concentrations of phenolic compounds and higher C:N (≈ 22), all of which are signatures of ombrotrophic peatlands (Clymo, 1963, Rydin & Jeglum, 2006) while the zone 2 was distinguished by a high nutrient content, higher C:N and alkaline pH. In contrast, the samples collected toward the edge of the peatland displayed a more mineralized and alkaline peat profile (**Figure V.4**, **Figure V.5**). Combining with field observations, Bernadouze appears clearly as mixed peatland with ombrotrophic-minerotrophic profile co-occurring within the same system. Surprisingly, we found that habitats had a weak effect in explaining environmental heterogeneity, except for pH which was well explained by the interaction between habitats and zones, highlighting a higher spatial heterogeneity in pH at lower depth (**Figure V.3**, **Figure V.4**). This absence of clear differences between habitats is in contradiction with what have been reported in the literature where studies have shown significant variations in the concentrations of phenolic compounds in peat between hummock and hollow (Djurđević



et al., 2003), thus underlining the role of environmental parameters on phenol production in *Sphagnum*. Variations in nutrients content (nitrogen, phosphorus and potassium) have also been recorded between habitats based on the idea that nutrient input are higher in the hollow due its proximity with the water table (Payette & Rochefort, 2001).

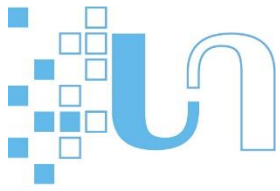
Regarding the microbial diversity, our results were in agreement with what has been commonly reported in peatlands, with the presence of Acidobacteria in acidic areas of Bernadouze (Finn *et al.*, 2020) and the presence of Proteobacteria at higher pH (Zhou *et al.*, 2017). The dominance of Crenarchaeota and Chloroflexi were also congruent with other studies (e.g. Lin *et al.* 2014, but see Payette & Rochefort, 2001, Kujala *et al.*, 2018). However, and interestingly, we documented a low abundance of Euryarchaeota (methanogenic Archaea) as it was recently reported in other Pyrenean peatlands (Richy *et al.*, *in prep*) and in some American and Canadian peatlands (Seward *et al.*, 2020). Nonetheless, in some northern peatlands, Euryarchaeota can account for up to one third of the total abundance (e.g. Mondav *et al.*, 2017). We also detected the presence of Thaumarchaeota restricted to the *Sphagnum*-dominated zone. Thaumarchaeota are known for their ability to oxidize ammonium (DeLong, 1992) and were detected in many terrestrial and aquatic environments (Karner *et al.*, 2001), sometimes in acidic soils (Tripathi *et al.*, 2013). In peatlands, Thaumarchaeota have been also recorded in deep anoxic peat (Lin *et al.*, 2015). Among the Thaumarchaeota, we detected very few ASVs assigned to Nitrososphaera. This could be seen as an unexpected result since this class of Thaumarchaeota of non-ammonia oxidation associated growth in soil (Weber *et al.*, 2015) has been identified as one the most abundant Archaea in soil at relatively low pH with high humidity, preferring high organic matter and low nitrate concentration (Isoda *et al.*, 2017). Finally, obligate host associate Nanoarchaeota phylum was found in all samples of the peatland. Nanoarchaeota have been identified in various habitats, such as mesophilic hypersaline water, sediments (Casanueva *et al.*, 2008) and acidic thermal pools (Mardanov *et al.*, 2018) but their presence and functions in soil ecosystems remained unclear. To our knowledge, this is the first study documenting the presence of Nanoarchaeota in peatlands.

In this study, we documented a strong horizontal and vertical structure for alpha and beta diversity (effect of zones and depth) but we did not notice any no specific differences between campaigns. This last finding is congruent with similar results reporting for other peatlands where no clear temporal changes in peat microbial community composition was identified (Lin *et al.*, 2014, Chroňáková *et al.*, 2019). However, seasonal variations could have been masked by lateral variation caused by vegetation distribution or other



environmental gradients at the peatland level. We cannot exclude that the seasonal effect could be much more visible on other facets of the communities such as functional or phylogenetic diversity.

Regarding the effect of the environmental variables in driving microbial diversity, our Procrustes analyses revealed a strong and significant link between environmental and compositional dissimilarity within the peatland reflecting therefore the structural role of environmental heterogeneity in constraining species distribution throughout the landscape. Results of our model selection procedure revealed the major role of pH, distance to the water table and C:N in driving alpha and beta diversity. pH is known to be an important determinant for the activity, diversity, and composition of the microbial community in soil (Rousk *et al.*, 2010) but also in peatlands (Seward *et al.*, 2020). The diversity and composition of microbial communities are constrained by soil pH due to the fact that most bacterial taxa have relatively narrow growth tolerances (Rosso *et al.*, 1995). This was demonstrated in culture where bacterial species usually tolerate a narrow pH range for their individual growth (Rosso *et al.*, 1995). Moreover, it has been reported that pH optimum for natural bacterial communities are closely constrained to their *in situ* pH (Fernández-Calviño & Bååth, 2010). For instance, a deviation of 1.5 pH units from *in situ* pH could reduce their activity by 50% (Fernández-Calviño & Bååth, 2010). These narrow pH optima for bacteria would explain the strong relationship between bacterial community composition and soil pH. Nonetheless, the importance of pH as a major predictor of microbial diversity has been recently questioned (e.g. Hendershot *et al.*, 2017). Interestingly, the relationship with pH we reported for ASV richness exhibited a hump-shaped form with acidic and alkaline peat tending to harbour reduced richness, and moderately acidic (pH=6) peat harbouring higher diversity. Such unimodal relationships have been already documented in soil for several microbial groups (Tripathi *et al.*, 2015, Delgado-Baquerizo & Eldridge, 2019) but to our knowledge, this is first time this pattern is identified at such small spatial scale and within a peatland. However, the analyses for the four most abundant phyla in Bernadouze reveal a lack of congruence between groups with Chloroflexi showing a positive relationship with pH while both Acidobacteria and Crenarchaeota displayed a negative relationship. Only Proteobacteria had a pattern consistent with a hump-shaped model. One possible explanation for this non-monotonic relationship with pH could be due to an increasing overlap of species distributional ranges along the pH gradient towards the center of the gradient producing therefore, a peak of richness toward pH 6, a phenomenon called the mid-domain effect (Colwell & Lees, 2000), originally proposed to explain the peak of diversity encountered at mid-altitude along elevation gradients. In the centre of the gradient, species associated with low pH values are found at the upper limit of their ecological niche, while species associated with higher pH values are found at the lower limit of their ecological niche, thus creating an apparent increase of diversity. The pH was also found to be one of the

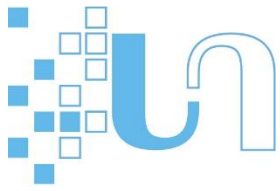


main drivers of beta diversity (here expressed with LCBD) with communities becoming more unique in their species composition as pH decreases. Again, this is mainly the reflection of the specific composition of the ombrotrophic zone of Bernadouze (zone 3), unique in its abiotic conditions and thus, in its prokaryotic assemblage.

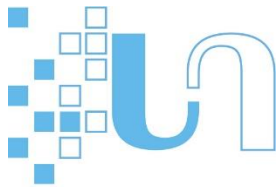
As expected, both ASV richness, evenness and LCBD were positively correlated with distance to the water table which is consistent with what have been reported in the literature for other peat profiles with (1) microbial diversity being typically higher in the shallowest (i.e. acrotelm) than in the deepest horizons (i.e. catotelm) and (2) the presence of a turn-over along the depth gradient indicating a change in composition of the microbial communities with depth. This pattern might be explained by a higher amount, more labile and diverse carbon source, and available nutrients near the surface originating from plant detritus and litter (Lin *et al.*, 2014), emphasizing therefore the importance of resource availability and peat property in structuring microbial communities in peat (Mondav, *et al.*, 2017). Interestingly, variation in carbon-to-nitrogen ratio (C:N) was not strongly correlated with depth, as it was found for other Pyrenean peatlands (Richy *et al. in prep*) but was mostly structured laterally with the zone 3 (ombrotrophic) and zone 2 (higher pH) exhibiting higher values of C:N, particularly in the deeper peat layers. The C:N is an indicator for peat degradation and one of the main factors regulating microbial processes such as nutrient mineralization and immobilization (Leifeld *et al.* 2020). Especially, for the ombrotrophic zone, high values of C:N was also related to high concentrations of phenolic compounds which may reflect the presence of fresh and poorly decomposed *Sphagnum* (Tfaily *et al.* 2015). Phenolic compounds released by *Sphagnum* may impact the decomposition rates by inhibiting microbial activity, and therefore favouring peat accumulation (Verhoeven & Toth, 1995). In this sense, samples with high values of C:N ratio were also characterised by low microbial richness and evenness even though a significant direct effect of the concentrations in phenolic compounds was not detected in our models. Even if we carefully controlled the multicollinearity in our analyses, we cannot exclude a possible correlation between C:N and phenolic compounds in some areas of the peatland that could have masked the effect of the latter.

V.5. CONCLUSION

Our study is one of the few published to date that aimed to quantify the environmental variability and microbial diversity at a fine spatial scale within a peatland, taking into account the main sources of variation such as seasons, habitats, hydrogenetic types or depth. Moreover, our study allowed strengthening our knowledge on the internal abiotic drivers of the microbial diversity and composition within a peatland by revealing the preponderant role of pH, distance to water table and C:N in structuring lateral and horizontal distribution of prokaryotic communities. We have also documented a hump-shaped

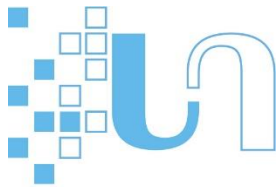


relationship between pH and microbial richness that echoes a well-known macroecological pattern, the mid-domain effect which explains the presence of peaks at the centre of ecological gradients by an increase in the overlap of species distributional ranges towards the center of the gradient. Further analyses are therefore needed to verify whether such a mechanism could explain the non-monotonous relationship we observed. Our work is also part of a more global research project that seeks to document and better understand the microbial diversity of high-latitude Pyrenean peatlands (Richy et al. *in prep*). In this context, our study contributes also to strength our knowledge on these emblematic and yet poorly studied ecosystems.

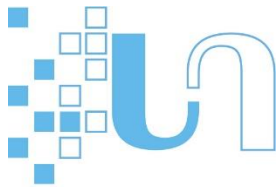


V.6. REFERENCES

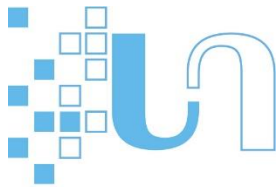
- Abdalla M, Hastings A, Truu J, Espenberg M, Mander Ü & Smith P (2016) Emissions of methane from northern peatlands: a review of management impacts and implications for future management options. *Ecol Evol* 6, 7080-7102.
- Anderson MJ (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol* 26, 32-46.
- Armentano TV & Menges ES (1986) Patterns of Change in the Carbon Balance of Organic Soil-Wetlands of the Temperate Zone. *J Ecol* 74, 755-774.
- Boylen E, Rideout J, Dillon M, Bokulich N, Abnet C, Al-Ghalith G, Alexander A, Alm E, Arumugam A & Asnicar F (2018) QIIME 2: reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science. *PeerJ Preprints* 6: e27295v27292.
- Burnham KP & Anderson DR (2002) A practical information-theoretic approach. *Model selection and multimodel inference* 2.
- Cadillo-Quiroz H, Yashiro E, Yavitt JB & Zinder SH (2008) Characterization of the archaeal community in a minerotrophic fen and terminal restriction fragment length polymorphism-directed isolation of a novel hydrogenotrophic methanogen. *Appl Environ Microbiol* 74, 2059-2068.
- Cardoso P, Rigal F & Carvalho JC (2015) BAT–Biodiversity Assessment Tools, an R package for the measurement and estimation of alpha and beta taxon, phylogenetic and functional diversity. *Methods Ecol Evol* 6, 232-236.
- Casanueva A, Galada N, Baker GC, Grant WD, Heaphy S, Jones B, Yanhe M, Ventosa A, Blamey J & Cowan DA (2008) Nanoarchaeal 16S rRNA gene sequences are widely dispersed in hyperthermophilic and mesophilic halophilic environments. *Extremophiles* 12, 651-656.
- Chroňáková A, Bárta J, Kaštovská E, Urbanová Z & Pícek T (2019) Spatial heterogeneity of belowground microbial communities linked to peatland microhabitats with different plant dominants. *FEMS Microbiol Ecol* 95.
- Clymo R (1963) Ion exchange in Sphagnum and its relation to bog ecology. *Ann Bot* 27, 309-324.
- Clymo R (1984) The limits to peat bog growth. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 303, 605-654.
- Clymo R, Turunen J & Tolonen K (1998) Carbon accumulation in peatland. *Oikos* 368-388.
- Colwell RK & Lees DC (2000) The mid-domain effect: geometric constraints on the geography of species richness. *Trends Ecol Evol* 15, 70-76.
- Delgado-Baquerizo M & Eldridge DJ (2019) Cross-biome drivers of soil bacterial alpha diversity on a worldwide scale. *Ecosystems* 22, 1220-1231.
- DeLong EF (1992) Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 5685-5689.
- Djurdjević L, Dinić A, Mitrović M, Pavlović P & Tešević V (2003) Phenolic acids distribution in a peat of the relict community with Serbian spruce in the Tara Mt. forest reserve (Serbia). *Eur J Soil Biol* 39, 97-103.
- Emsens W-J, van Diggelen R, Aggenbach CJ, Cajthaml T, Frouz J, Klimkowska A, Kotowski W, Kozub L, Liczner Y & Seeber E (2020) Recovery of fen peatland microbiomes and predicted functional profiles after rewetting. *ISME J* 14, 1701-1712.
- Fernández-Calviño D & Bååth E (2010) Growth response of the bacterial community to pH in soils differing in pH. *FEMS Microbiol Ecol* 73, 149-156.
- Finn DR, Ziv-El M, van Haren J, Park JG, del Aguila-Pasquel J, Urquiza-Muñoz JD & Cadillo-Quiroz H (2020) Methanogens and Methanotrophs Show Nutrient-Dependent Community Assemblage Patterns



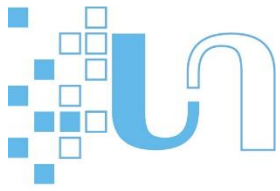
- Across Tropical Peatlands of the Pastaza-Marañón Basin, Peruvian Amazonia. *Front Microbiol.* 11, 746.
- Glassman SI, Weihe C, Li J, Albright MB, Looby CI, Martiny AC, Treseder KK, Allison SD & Martiny JB (2018) Decomposition responses to climate depend on microbial community composition. *Proc Natl Acad Sci USA* 115, 11994-11999.
- Hendershot JN, Read QD, Henning JA, Sanders NJ & Classen AT (2017) Consistently inconsistent drivers of microbial diversity and abundance at macroecological scales. Wiley Online Library.
- Hervé M & Hervé MM (2020) Package 'RVAideMemoire'. See <https://CRAN.R-project.org/package=RVAideMemoire>.
- Isoda R, Hara S, Tahvanainen T & Hashidoko Y (2017) Comparison of archaeal communities in mineral soils at a boreal forest in Finland and a cold-temperate forest in Japan. *Microbes Environ* ME17100.
- Ivanova AA, Beletsky AV, Rakitin AL, Kadnikov VV, Philippov DA, Mardanov AV, Ravin NV & Dedysh SN (2020) Closely Located but Totally Distinct: Highly Contrasting Prokaryotic Diversity Patterns in Raised Bogs and Eutrophic Fens. *Microorganisms* 8, 484.
- Jalut G, Delibrias G, Dagnac J, Mardones M & Bouhours M (1982) A palaeoecological approach to the last 21 000 years in the Pyrenees: the peat bog of Freychinède (alt. 1350 m, Ariège, South France). *Palaeogeogr, Palaeoclimatol, Palaeoecol* 40, 321-359.
- Jansson JK & Hofmockel KS (2020) Soil microbiomes and climate change. *Nature Reviews Microbiology* 18, 35-46.
- Joosten H & Clarke D (2002) Wise use of mires and peatlands. *International Mire Conservation Group and International Peat Society* 304.
- Karner MB, DeLong EF & Karl DM (2001) Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* 409, 507-510.
- Kim S-Y, Lee S-H, Freeman C, Fenner N & Kang H (2008) Comparative analysis of soil microbial communities and their responses to the short-term drought in bog, fen, and riparian wetlands. *Soil Biol Biochem* 40, 2874-2880.
- Kujala K, Mikkonen A, Saravesi K, Ronkanen A-K & Tirola M (2018) Microbial diversity along a gradient in peatlands treating mining-affected waters. *FEMS Microbiol Ecol* 94, 145.
- Laine J & Vasander H (1996) Ecology and vegetation gradients of peatlands. *Peatlands in Finland* 10, 20.
- Legendre P & De Cáceres M (2013) Beta diversity as the variance of community data: dissimilarity coefficients and partitioning. *Ecol Lett* 16, 951-963.
- Leifeld J & Menichetti L (2018) The underappreciated potential of peatlands in global climate change mitigation strategies. *Nature Communications* 9, 1071.
- Leifeld J, Klein K & Wüst-Galley C (2020) Soil organic matter stoichiometry as indicator for peatland degradation. *Sci Rep* 10, 1-9.
- Lew S, Glińska-Lewczuk K & Lew M (2019) The effects of environmental parameters on the microbial activity in peat-bog lakes. *PLoS One* 14: e0224441.
- Lin X, Handley KM, Gilbert JA & Kostka JE (2015) Metabolic potential of fatty acid oxidation and anaerobic respiration by abundant members of Thaumarchaeota and Thermoplasmata in deep anoxic peat. *ISME J* 9, 2740-2744.
- Lin X, Green S, Tfaily MM, Prakash O, Konstantinidis KT, Corbett JE, Chanton JP, Cooper WT & Kostka JE (2012) Microbial Community Structure and Activity Linked to Contrasting Biogeochemical Gradients in Bog and Fen Environments of the Glacial Lake Agassiz Peatland. *Appl Environ Microbiol* 78, 7023-7031.



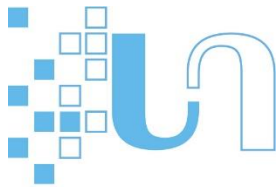
- Lin X, Tfaily MM, Steinweg JM, Chanton P, Esson K, Yang ZK, Chanton JP, Cooper W, Schadt CW & Kostka JE (2014) Microbial community stratification linked to utilization of carbohydrates and phosphorus limitation in a boreal peatland at Marcell experimental forest, Minnesota, USA. *Appl Environ Microbiol* 80, 3518-3530.
- Linn DM & Doran JW (1984) Effect of water-filled pore space on carbon dioxide and nitrous oxide production in tilled and nontilled soils. *Soil Sci Soc Am J* 48, 1267-1272.
- Lluch J, Servant F, Païssé S, et al. (2015) The characterization of novel tissue microbiota using an optimized 16S metagenomic sequencing pipeline. *PLoS One* 10.
- Mardanov AV, Gumerov VM, Beletsky AV & Ravin NV (2018) Microbial diversity in acidic thermal pools in the Uzon Caldera, Kamchatka. *Antonie Van Leeuwenhoek* 111, 35-43.
- McAndrew D & Malhi S (1992) Long-term N fertilization of a solonchic soil: effects on chemical and biological properties. *Soil Biol Biochem* 24, 619-623.
- McGuire KL & Treseder KK (2010) Microbial communities and their relevance for ecosystem models: decomposition as a case study. *Soil Biol Biochem* 42, 529-535.
- Mondav R, McCalley CK, Hodgkins SB, Frolking S, Saleska SR, Rich VI, Chanton JP & Crill PM (2017) Microbial network, phylogenetic diversity and community membership in the active layer across a permafrost thaw gradient. *Environ Microbiol* 19, 3201-3218.
- Moore TR, Bubier JL & Bledzki L (2007) Litter Decomposition in Temperate Peatland Ecosystems: The Effect of Substrate and Site. *Ecosystems* 10, 949-963.
- Morales SE, Mouser PJ, Ward N, Hudman SP, Gotelli NJ, Ross DS & Lewis TA (2006) Comparison of bacterial communities in New England Sphagnum bogs using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). *Microb Ecol* 52, 34-44.
- Morrissey MB & Ruxton GD (2018) Multiple regression is not multiple regressions: the meaning of multiple regression and the non-problem of collinearity.
- Nichols JE & Peteet DM (2019) Rapid expansion of northern peatlands and doubled estimate of carbon storage. *Nat Geosci* 12, 917-921.
- Oksanen J, Blanchet F, Kindt R, Legendre P, Minchin P, O'Hara R, Simpson G, Solymos P, Henry M & Stevens H (2013) Vegan: Community Ecology Package. 2013. R-package version 2.0-10.
- Pankratov TA, Ivanova AO, Dedysh SN & Liesack W (2011) Bacterial populations and environmental factors controlling cellulose degradation in an acidic Sphagnum peat. *Environ Microbiol* 13, 1800-1814.
- Pankratov TA, Serkebaeva YM, Kulichevskaya IS, Liesack W & Dedysh SN (2008) Substrate-induced growth and isolation of Acidobacteria from acidic Sphagnum peat. *ISME J* 2, 551-560.
- Payette S & Rochefort L (2001) *Écologie des tourbières du Québec-Labrador*. Presses Université Laval.
- Peres-Neto PR & Jackson DA (2001) How well do multivariate data sets match? The advantages of a Procrustean superimposition approach over the Mantel test. *Oecologia* 129, 169-178.
- Piccolo MC, Neill C, Melillo JM, Cerri CC & Steudler PA (1996) 15 N natural abundance in forest and pasture soils of the Brazilian Amazon Basin. *Plant Soil* 182, 249-258.
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S & Sarkar D (2012) R Development Core Team (2012). 'nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R Package Version 3.1-105.'. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
- Rasmussen S, Wolff C & Rudolph H (1995) Compartmentalization of phenolic constituents in Sphagnum. *Phytochemistry* 38, 35-39.
- Ratcliffe JL, Peng H, Nijp J & Nilsson MB (2020) Northern peatland depth and lateral expansion is inconsistent with a 1055 GtC estimate of carbon storage.

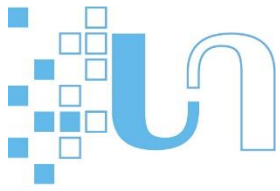


- Reille M (1990) Nouvelles recherches pollenanalytiques à Freychinède, Pyrénées ariégeoises, France. *Laboratoire de Botanique Historique et Palynologie* 1-10.
- Rosset T, Binet S, Antoine J-M, Lerigoleur E, Rigal F & Gandois L (2020) Drivers of seasonal-and event-scale DOC dynamics at the outlet of mountainous peatlands revealed by high-frequency monitoring. *Biogeosciences* 17, 3705-3722.
- Rosso L, Lobry J, Bajard S & Flandrois J-P (1995) Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Appl Environ Microbiol* 61, 610-616.
- Rousk J, Baath E, Brookes PC, Lauber CL, Lozupone C, Caporaso JG, Knight R & Fierer N (2010) Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME J* 4, 1340-1351.
- Rydin H & Jeglum JK (2006) Peatlands around the world. *The biology of peatlands*, Oxford University Press.
- Rydin H & Jeglum J (2015) *The Biology of Peatlands*.
- Rydin H, Gunnarsson U & Sundberg S (2006) The role of Sphagnum in peatland development and persistence. *Boreal peatland ecosystems*, 47-65. Springer.
- Rydin H, Jeglum JK & Bennett KD (2013) *The biology of peatlands*, 2e. Oxford university press.
- Seward J, Carson MA, Lamit LJ, Basiliko N, Yavitt JB, Lilleskov E, Schadt CW, Smith DS, McLaughlin J & Mykityczuk N (2020) Peatland microbial community composition is driven by a natural climate gradient. *Microb Ecol*.
- Sjors H (1981) zonation of northern peatlands and their importance for the carbon balance of the atmosphere. *International journal of ecology and environmental sciences*.
- Thormann MN, Szumigalski AR & Bayley SE (1999) Aboveground peat and carbon accumulation potentials along a bog-fen-marsh wetland gradient in southern boreal Alberta, Canada. *Wetlands* 19, 305-317.
- Tripathi BM, Kim M, Lai-Hoe A, Shukor NA, Rahim RA, Go R & Adams JM (2013) pH dominates variation in tropical soil archaeal diversity and community structure. *FEMS Microbiol Ecol* 86, 303-311.
- Tripathi BM, Kim M, Tateno R, Kim W, Wang J, Lai-Hoe A, Shukor NAA, Rahim RA, Go R & Adams JM (2015) Soil pH and biome are both key determinants of soil archaeal community structure. *Soil Biol Biochem* 88, 1-8.
- Tsitko I, Lusa M, Lehto J, Parviainen L, Ikonen ATK, Lahdenperä A-M & Bomberg M (2014) The variation of microbial communities in a depth profile of an acidic, nutrient-poor boreal bog in Southwestern Finland. *Open Journal of Ecology* 04, 13-28.
- Turetsky MR, Kotowska A, Bubier J, et al. (2014) A synthesis of methane emissions from 71 northern, temperate, and subtropical wetlands. *Global Change Biol* 20, 2183-2197.
- Turunen J, Tomppo E, Tolonen K & Reinikainen A (2002) Estimating carbon accumulation rates of undrained mires in Finland—application to boreal and subarctic regions. *The Holocene* 12, 69-80.
- van Groenigen JW, Velthof GL, van der Bolt FJ, Vos A & Kuikman PJ (2005) Seasonal variation in N₂O emissions from urine patches: effects of urine concentration, soil compaction and dung. *Plant Soil* 273, 15-27.
- Verhoeven JTA & Toth E (1995) Decomposition of Carex and Sphagnum litter in fens: Effect of litter quality and inhibition by living tissue homogenates. *Soil Biol Biochem* 27, 271-275.
- Vitt DH (2013) Peatlands☆. *Encyclopedia of Ecology (Second Edition)*, (Fath B, ed.) 557-566. Elsevier, Oxford.
- Wang M, Tian J, Bu Z, Lamit LJ, Chen H, Zhu Q & Peng C (2019) Structural and functional differentiation of the microbial community in the surface and subsurface peat of two minerotrophic fens in China. *Plant Soil* 437, 21-40.
- Weber EB, Lehtovirta-Morley LE, Prosser JI & Gubry-Rangin C (2015) Ammonia oxidation is not required for growth of Group 1.1 c soil Thaumarchaeota. *FEMS Microbiol Ecol* 91, fiv001.



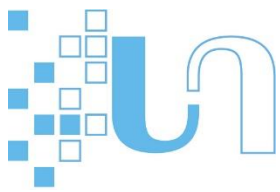
- Wheeler B & Proctor M (2000) Ecological gradients, subdivisions and terminology of north-west European mires. *J Ecol* 88, 187-203.
- Yu Z, Loisel J, Brosseau DP, Beilman DW & Hunt SJ (2010) Global peatland dynamics since the Last Glacial Maximum. *Geophys Res Lett* 37.
- Zhou X, Zhang Z, Tian L, Li X & Tian C (2017) Microbial communities in peatlands along a chronosequence on the Sanjiang Plain, China. *Sci Rep* 7, 9567.





Partie n°6

Une approche génome-centrée et un réseau de cooccurrence révèlent le rôle des bactéries et des archées dans la dégradation de la matière organique dans une tourbière pyrénéenne (Bernadouze, France)



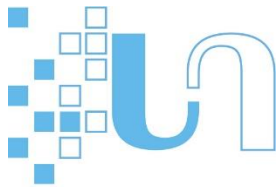
Partie VI. Une approche génome-centrée et un réseau de cooccurrence révèlent le rôle des bactéries et des archées dans la dégradation de la matière organique dans une tourbière pyrénéenne (Bernadouze, France)

Le travail présenté dans ce chapitre a été réalisé en collaboration avec des membres du laboratoire Evolutionary Genomics Group de l'Université Miguel Hernández (Elche, Espagne), Francisco Rodriguez-Valera, Pedro J Cabello-Yeves et le Felipe Hernandes Coutinho. Lauréat de la bourse E2S-UPPA « International Doctoral Mobility », j'ai effectué un séjour de 9 mois en Espagne pour y apprendre l'analyse des séquences (méta) génomiques, depuis le nettoyage des lectures brutes jusqu'à l'assemblage de génomes.

Contexte de l'étude

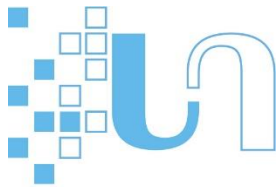
Dans les parties 4 et 5 nous avons décrit la diversité microbienne de manière exhaustive dans quatre tourbières pyrénéennes, et mis en évidence le rôle primordial des conditions environnementales sur la structure des communautés. Cependant, nous ne savons pas précisément le rôle de ces microorganismes dans le fonctionnement de ces tourbières. Dans ce chapitre, nous proposons d'utiliser la métagénomique non-ciblée afin de pouvoir caractériser les fonctions métaboliques des bactéries et des archées de la tourbière de Bernadouze.

Le séquençage Illumina de nouvelle génération permet le séquençage de génomes microbiens directement depuis des échantillons environnementaux (*de novo*). Cette méthode consiste à fragmenter aléatoirement de l'ADN en millions de fragments, qui vont ensuite être massivement séquencés et réassemblés pour former des séquences génomiques. À l'aide d'outils bioinformatiques puissants, ces séquences vont pouvoir être assemblées en séquences de plus grande taille, puis en génomes. Ainsi, il sera possible d'identifier une partie des bactéries et des archées présents dans ces échantillons, et de connaître les fonctions métaboliques portées par chacun des génomes reconstruits. Cela permet aussi de pouvoir étudier la diversité microbienne incultivable en laboratoire et la plupart des fonctions associées à ces communautés. Cette approche présente donc de nombreux avantages dans l'étude des tourbières, qui abritent un grand nombre de microorganismes peu décrits, dont on ne connaît pas les fonctions dans l'environnement.



Ainsi, la partie n°6 propose d'utiliser le séquençage nouvelle génération Illumina (128 millions de reads par échantillon de taille de 136 bp en moyenne) et Pacbio long-read pour étudier le potentiel métabolique des microorganismes de Bernadouze. L'assemblage de séquences en contigs puis en génomes, permettra d'identifier les capacités métaboliques des bactéries et des archées. Le séquençage Pacbio Sequel II (« Single Molecule, Real-Time (SMRT) Sequencing technology ») permet de séquencer de façon précise des longs fragments d'ADN (10 millions de reads par échantillon de taille de 7 kb en moyenne), permettant de diminuer les erreurs liées à l'assemblage des lectures en génome. Il permet aussi de séquencer à travers les îlots génomiques, c'est-à-dire des régions de composition d'ADN inhabituelle issues d'un transfert de gène horizontal, qui possèdent généralement les caractéristiques d'éléments mobiles d'ADN ou de « hot-spot » de recombinaison. Ces régions posant des problèmes récurrents lors de l'assemblage de génomes, le séquençage Pacbio permet de les contourner en partie.

Afin d'assembler un plus grand nombre de génomes différents, les échantillons les plus contrastés ont été sélectionnés. Nous avons analysé trois profils de profondeur de butte ainsi que les échantillons de surface des gouilles des sites 2, 3 et 5. Les échantillons ont été choisis parmi la campagne du printemps (froide et humide) et celle de la fin d'été (chaude et sèche). La librairie a été préparée sans amplification PCR ce qui permet de ne pas biaiser la représentativité des microorganismes. L'assemblage a été conduit sur chaque échantillon indépendamment.



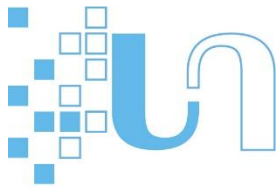
Genome-centric approach and co-occurrence network reveal the role of Bacteria and Archaea in the degradation of organic matter in a Pyrenean peatland (Bernadouze, France)

(In prep)

VI.1. INTRODUCTION

Peatlands play a key role in climate regulation and carbon cycle. While peatland occupying only 3% of the global land surface (Xu et al., 2018), up to 600 Gt of C is stored in peat across the globe (Yu et al., 2010), representing about 25% of the global soil C stock. In these ecosystems, water saturation combined to acidic conditions, low nutrient concentration and Sphagnum-produced inhibitory compounds slow down the decomposition of organic matter (Belyea, 1996; Bragazza et al., 2007; Bridgham and Richardson, 2002; Clymo et al., 1998; Gorham, 1991). As a result, the plant primary production exceeds the microbial decomposition, leading to an accumulation of organic matter. Peatlands carbon stocks are however under threats due to the effect of climate change (e.g. increase of temperature and dryer conditions) and direct anthropogenic disturbances (Poeplau and Don, 2013; Sainju et al., 2008).

To date, most surveys conducted to describe the prokaryotic component of peatlands have targeted the 16S rRNA gene, providing a general view of archaeal and bacterial diversity in peatlands (e.g. Andersen et al., 2013; Seward et al., 2020). Although of interest for investigating the drivers at work in ecosystems, metabarcoding is of limited support to decipher microorganisms bearing functionalities that are of importance in any ecosystems. Similarly studies focusing on global microorganisms features or potential such as biomass (Arai et al., 2014) or enzymatic activities (Preston et al., 2012; Sjögersten et al., 2011) do not authorize the identification of key microorganisms driving main ecosystem functioning and ecological processes e.g., organic matter degradation and greenhouse gases (GHG) production. Nowadays, progress made in sequencing technologies authorize to deepen our knowledge of microbial communities through non-target metagenomics or metatranscriptomics. This has led to the discovery of new lineages (Brown et al., 2015; Castelle and Banfield, 2018), the detection of unsuspected metabolic capacities in different phyla (Evans et al., 2015; Hausmann et al., 2018) and the identification of new microbial interactions (Zhang et al., 2020; Zhu et al., 2019). Recently, studies conducted on permafrost and grassland have shown

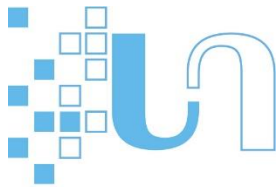


that a comprehensive view of ecosystem functioning can be deduced from a broad genomic resolution and community metabolic functions (Diamond et al., 2019; Woodcroft et al., 2018).

Due to the pressure that climate change may exert on permafrost and peatlands an important knowledge has been gained in using such approaches (Graham et al., 2019; St. James et al., 2021; Woodcroft et al., 2018; Xue et al., 2020). Importantly, investigations performed to date using metabarcoding have revealed that numerous microorganisms thriving in peatlands do not have a genome representative suggesting an important fraction of microbial dark matter in these ecosystems (Dedysh, 2011). As a consequence, the poor knowledge precludes the identification of the most important actors involved in carbon regulation in peatlands and the environmental parameters that control these microorganisms.

In this study, we investigated the archaeal and bacterial metagenomes through a genome-centric approach of a mountainous peatland (Bernadouze peatland) located at 1300 m asl in the Pyrenees. Due to its size and its altitude, this peatland is representative of the type of peatlands identified in southwestern Europe alpine and montane areas. It faces contrasted climatic conditions over the year, hot and dry summers and cold and snowy winters. The peatland is also characterized by an ombrotrophic-minerotrophic gradient typical of mix peatland type. Our first objectives was to encompass as much as possible the spatial heterogeneity of the peatland to maximize microbial dark matter discovery and to identify the niches of some representative microorganisms in this ecosystem. We then scrutinized the functional potential of the MAG (Metagenome-Assembled Genome) with a special focus on function involved in the degradation of organic matter capacities in individual MAG, in particular plant-derived polysaccharides (cellulose, hemicellulose), and in methanogenesis.

Overall, our data reveal significant phylogenetic stratification in the peatland linked with a different functional potential. This study characterizes many poorly sequenced microorganisms and determines their potential role in carbon cycling. We also define the ecological niches of the recovered genomes, and identify which environmental factors contribute to better explain the microbial assemblages.



VI.2. MATERIALS AND METHODS

Study site description, sample collection, DNA extraction and geochemical parameters measurement.

Peat samples were collected at Bernadouze (42.80247 N, 1.42333 E), a peatland located at an altitude of 1344m in the Eastern part of the French Pyrenean mountains (**Figure VI.1**). The peatland covers an area of 4.7 ha with an average peat depth of 2 m. It has a watershed of 1.4 km² composed mainly of limestone rocks. The Bernadouze peatland was formed from a postglacial lake, where a marsh existed for 10,000 years (Jalut et al., 1982; Reille, 1990). Oriented to the east, it is subject to oceanic influence, but weather conditions may be contrasted due to specific mountainous topography. The mean annual temperature recorded for the years 2015 to 2018 was 7.9 ± 0.3 °C and the mean annual precipitation was 1797 ± 265 mm. Sub-zero temperatures and snowfalls are frequently recorded at Bernadouze from mid-October to mid-May (Rosset et al. 2020).

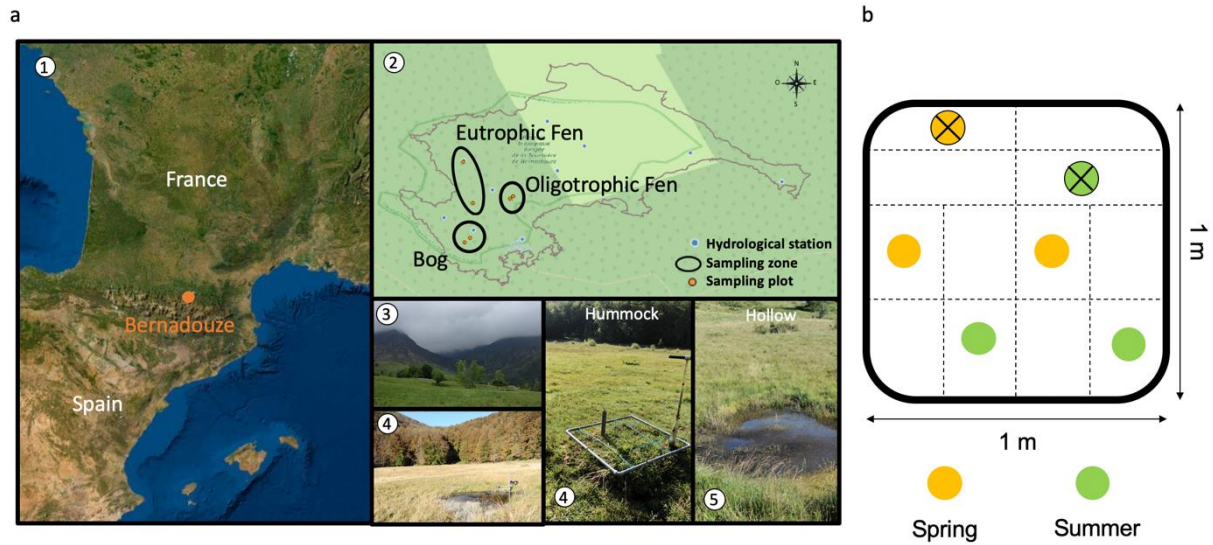
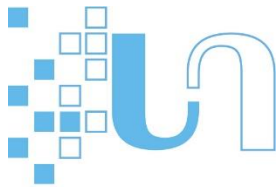


Figure VI.1. Study site and sampling procedure.

a1. Location of the Bernadouze peatland in the central part of the Pyrenees, France. a2. Location of sampling areas in the three different habitats (bog, oligotrophic fen and eutrophic fen). a3-4. View of the peatland in the two sampling seasons (spring and summer respectively). Photograph of one of the two sampled habitats, a5. hummock with quadrat, piezometer and Russian corer, a6. hollow. **Figure VI.1b** shows the sampling strategy used: a quadrat was positioned on the surface of the hummock and the hollow to collect the core in triplicate. A sample at 7.5 cm, 42.5 cm and 92.5 cm was taken from the three cores. In a second step, the triplicates were homogenized in liquid nitrogen using a pestle and mortar.

Two sampling campaigns were carried out the 12-13th of June 2018, just after the melt of the last snow patches and the 4-5th of September 2018, at the end of the growing season. For each campaign, one ombrotrophic and two minerotrophic zones (one oligotrophic and eutrophic) were sampled (**Figure VI.1**). For each zone, we selected two sampling sites one on a hummock and one on a hollow. For the hummocks, we placed a 1 m² quadrat and collected three cores of one meter depth (triplicate) using a Russian-type peat corer (5 cm × 50 cm). Because our corer was 50 cm length, one core (one replicate) was therefore made of two consecutive coring in order to reach one-meter length (**Figure VI.1**). For the hollow, we collected our triplicate at 20 to 30 cm from the edge, keeping one meter distance between each coring. For each core, we collected samples of 15 cm at three different depth: subsurface (from 0 to 15 cm) mid-



depth (from 35 to 50 cm) and at the bottom of core (from 85 to 100 cm). For each sample, we recorded the temperature of the peat using a digital soil thermometer. We collected a first subsample of peat in a 5ml tube which was directly transferred in a portable liquid nitrogen container for the molecular analyses a second subsample was taken from which we extracted the pore water to measure the pH using Multiparameter MultiLine WTW® 3510 (Sentix 940 sensor). All the aforementioned manipulations were made directly in the field few minutes after the coring. In each site, we also installed a piezometer and the water-table level was recorded the day after. Finally, for each site and for each depth, we pooled and mixed the triplicate into a plastic bag for further biogeochemical analyses.

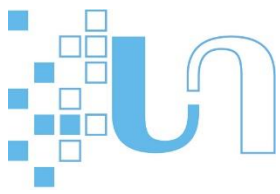
In the laboratory, the triplicate was homogenized and crushed in porcelain bowls placed in liquid nitrogen and DNA extraction was performed using DNeasy PowerSoil kit following the manufacturer's instructions (MO BIO Laboratories, UK). In total, 24 samples were analyzed. DNA for PacBio sequencing were from a second extraction using DNeasy PowerSoil Pro kit with slight modification in order to ensure the recovery of high molecular weight DNA. The total organic carbon, total nitrogen and C/N mass ratio were determined using a FLASH 2000 ThermoFisher™ elemental analyzer. Major cation and anions (e.g. NO₂, NO₃, SO₄²⁻, NH₄⁺, PO₄³⁻) were quantified using High Performance Ion Chromatography (Dionex Ics-5000+ (Anions); Dionex DX-120 (Cations)) (See Part III.3.2 for further details). For each sample, free phenol was also quantified as specified in section III.3.3.

Sequencing and assembly

Sequencing was performed using Illumina NovaSeq 6000 without prior PCR amplification while 2 of the 24 samples sequenced were also sequenced using Pacbio Sequel II 8M SMRT Cell Run (University of Maryland School of Medicine, USA). Pacbio sequences were used to improve the quality of MAGs. The assembly of the metagenomes was conducted independently using IDBA-UD (Peng et al., 2012) with the following parameters: *mink*, 60; *maxk*, 120; *step*, 10; and *precorrection*. Similarly, long reads were assembled using hybrid SPADes, using the paired end Illumina metagenomes from the same PacBio sample.

Reads analysis

A subset of 20 million reads was used to calculate the GC content using GeeCee program from the EMBOSS package (Rice, 2000). Unassembled 16S rRNA read fragments were obtained using USEARCH (Edgar, 2010) with RefSeq 16S rRNA as database and then confirmed using *ssu-align* (Nawrocki and Eddy,



2010). Then, a BLASTN was performed against the SILVA database (Quast et al., 2012) (SILVA_138_SSURef_Nr99_Tax_silva from December 2019) to provide a taxonomic classification.

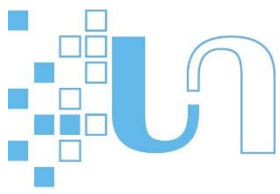
Genome Binning and MAG Quality Assessment

MAGs were obtained using MetaBAT2 (Kang et al., 2019). Briefly, contigs longer than 5kb (Illumina) and 10kb (PacBio) were indexed aligned to short read sequences. Next, SAMtools was used to sort BAM files and the contig coverage depth was calculated using MetaBAT2. Only MAGs with a completeness of > 50% and an average contamination < 5 % were retained for further analysis. To identify redundant genomes, the average nucleotide identity (ANI) score was calculated using a cutoff $\geq 95\%$ and only those non-redundant genomes with the highest quality scores or greatest overall sizes were kept. The taxonomic assignment of the MAGs as well as the phylogenomic reconstruction were performed using GTDB-TK (Chaumeil et al., 2019).

Genome abundances across samples were calculated as reads per kilobase of genome per gigabase of metagenome (RPKG). The raw reads were mapped against MAGs using BLASTN (Altschul et al., 1997) by applying a cutoff of sequence identity of 95% over a minimum alignment length of 50 nucleotides and an e-value $\leq 1 \times 10^{-5}$. We also estimated the binning efficiency of our datasets. This was determined by mapping raw reads from the metagenomes against all the dereplicated MAGs with Bowtie2. The sum of these mapped reads divided by the total number of reads (i.e. a subsampling of 10 million reads) allowed us to obtain an estimation of the metagenomic recovery percentage.

Genomes Annotation

In order to establish a robust annotation of the predicted proteins involved in carbohydrates degradation and glycoside hydrolase, genes annotation was performed using run_dbcan v2.0.11 (Zhang et al., 2018), screened using HMMER (Eddy, 1998), DIAMOND (Buchfink et al., 2015) and Hotpep (Busk et al., 2017) against dbcan, CAZy and PPR database respectively. To reach a minimum accuracy of 0.93%, only similar proteins prediction by at least two of the mentioned tools were kept to identify CAZyme. KEGG orthology numbers were assigned to proteins involved in fermentation metabolism using DIAMOND v0.9.14.115 against a non-redundant version of KEGG database. Only a hit was considered for a minimum alignment length of 30 amino acids and an E value of 1×10^{-5} . Genome encoding for a complete pathway was identified from the available KEGG modules and several custom modules.



Co-occurrence Network Analysis

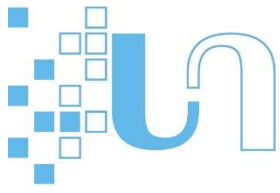
Correlation-based network analysis was performed to evaluate the co-occurrences between the 290 MAGs. Co-occurrences were quantified using Spearman's rank correlations calculated between all pairs of MAGs using their RPKG distribution (recruitment abundances) across the 24 samples. Only co-occurrences corresponding to correlations with a coefficient (ρ) > 0.6 and a statistical significance (p -value) < 0.001 were considered to build the network. (Ju et al. 2014). The network visualization was performed using Gephi software (Bastian et al., 2009) with nodes and the edges representing the MAGs and the correlations ($\rho > 0.6$ and $P < 0.001$) between MAG respectively. Network properties were assessed using a set of network topological indices namely the average node connectivity, average path length, average clustering coefficient and modularity; (Newman, 2003). Modularity was estimated using the method of Clauset et al. 2004 implemented in the R package *igraph* (Csardi et al. 2006).

Statistical Analyses

All the following statistical analyses were implemented within the R programming environment (R Development Core, 2018).

The archaeal and bacterial diversity of the metagenomes was estimated using the 16S rRNA gene recovered in each metagenome. For each sample, we first counted the number of taxa (richness) retrieved for each phylum and calculated the exponential of Shannon ($e^{H'}$) as our alpha diversity metric (Haegeman et al., 2013). The richness was used to test the relationship between the richness of the 16S rRNA gene and our ability to assemble MAGs in each metagenome using Pearson's correlation. We chose the richness for this analysis in order to obtain the best estimate of the complexity of each community present in the samples.

To evaluate the influence of microhabitats (hummock and hollow), sampling season and depth on the microbial distribution, we first calculated the Bray–Curtis distance between all pairs of samples, based on the 16S rRNA count in each metagenome at phylum-level and test the significance and strength of each factor using the multi-response permutation procedure (MRPP) implemented in the R package *vegan* (Oksanen, 2020). Results of the MRPP were visualized using non-metric multidimensional scaling ordinations (NMDS) based on Bray–Curtis distance matrices.



Principal component analysis (PCA) was performed to reduce the number of nutrient variables (SO_4^{2-} , NO_3^- , NH_4^+ and PO_4^{3-}) and thereby assist interpretation. The new nutrient variable was estimated by the first principal component that account for a large proportion of the variance in the data (64 %). Thus, we performed a random forest analysis to test the correct assignment of the MAGs to their actual module based on their environmental preferences (i.e. expressed as their individual weighting means calculated for each environment variables using RPKG data as abundance). Random forest analyses was performed using a set to 10000 trees and we calculated the importance of individual variables (i.e. weighting means) in predicting the module assignment. Models were fitted using the R package *randomForest* (Liaw & Wiener 2002)

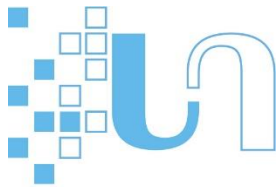
VI.3. RESULTS AND DISCUSSION

Geochemical properties and classification of the three sampling sites

In order to describe the environment of the bacterial and archaeal communities in Bernadouze peatland, different geochemical parameters were measured for each sample (one bog and two fens). We therefore reported a water table varying between -9 and -18 cm, on average, for all the samples collected in the peatland. As expected, the bog site was the most acidic (around 4.6) and the fens site exhibiting pH close to neutrality (around 6.4) (**Figure VI.1**). The C:N ratio and the nutrient content further distinguished the three sites, with one fen site characterized by oligotrophic conditions close to the one of the bog site: C:N ratios around 22.5, and low nutrient contents while the other fen site exhibit lower C:N ratio (around 17.5) and higher nutrient content (**Figure VI.2a**).

Metagenome assembly

In total, we generated 0.6 Tb of raw read data, which assembled into 14 Gbp of contiguous sequences. Of this total, 3 Gbp (21.4%) of the assembled sequences were ≥ 5 kb in length. Additionally, a sample of the hummock and hollow at 7.5 cm depth of the oligotrophic fen were also sequenced with Pacbio. We obtained approximately 10 million of reads per sample, with an average length of 7 kb. More than 14000 sequences were > 10 kb in length, with an average length of 23 kb. Here, the Pacbio data will be used to improve our capacity to assemble additional high-quality genomes.



Extensive sampling of Bernadouze peatland archaeal and bacterial diversity

In order to appreciate the sampling effort of our study we have we estimated archaeal and bacterial peatland diversity on a subset of the metagenomes (10 million of reads) by targeting 16S rRNA genes. Across our 24 metagenomic assemblies, we identified 44012 16S rRNA sequences (1834 ± 382 per sample). We detected 76 distinct phyla of which 61 phyla had a relative abundance below 1%. For comparison, this estimate is higher than the species richness revealed in a comparable study performed on a grassland soil suggesting that our sampling encompass a large range of Bernadouze environmental conditions (Diamond et al., 2019). The relative abundance between the most abundant and the less abundant phylum varied by a factor of 1000 (**Figure VI.2b**). About 5% of the phyla accounted for 61% of the total number of 16S rRNA genes (**Figure VI.2b**) showing that few phyla prevailed in the archaeal and bacterial communities. In agreement with previous peatland surveys (Richy et al., 2020 *in prep*), Proteobacteria and Acidobacteria were the most abundant lineages in the Bernadouze peatland. The relative abundance of the phyla was highly variable across sites. Acidobacteria, Thaumarchaeota and Verrucomicrobia were found in greater proportion in the bog, while the relative abundance of Chloroflexi, Planctomycetes, Nitrospirea were higher in the fen. In the eutrophic fen, Crenarchaeota were the most relatively abundant, while in the oligotrophic site, Proteobacteria dominated (**Figure VI.2b**).

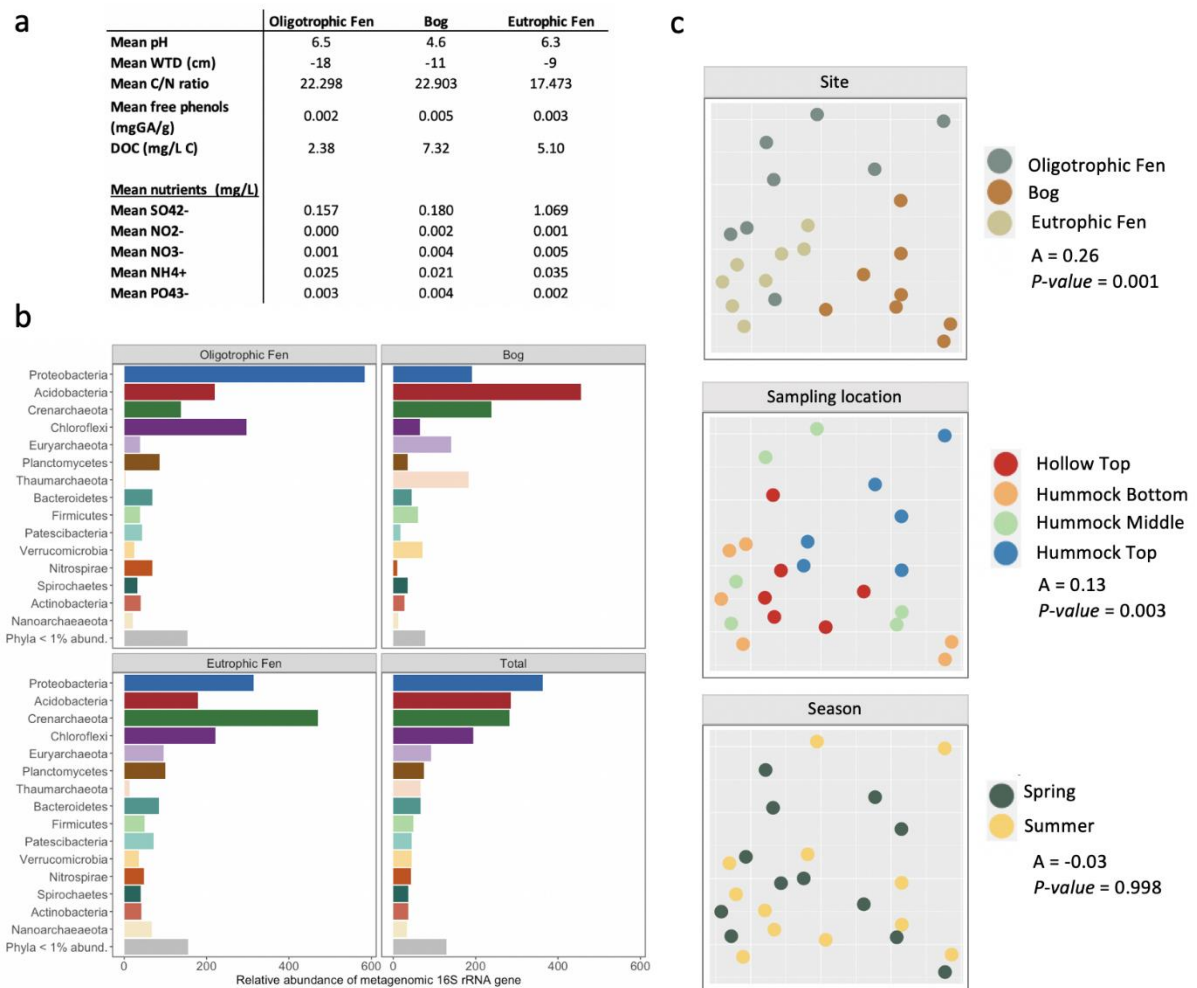
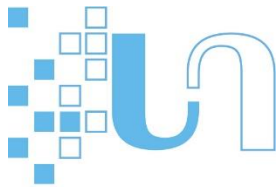


Figure VI.2. Environmental parameters, archaeal and bacterial diversity and influence of variables.

a.) Geochemical properties in three studied sites of Bernadouze peatland: the oligotrophic fen, the bog and the eutrophic fen. b.) Relative abundances of the 16S rRNA gene per sites and in the whole peatland (Total), at phylum-level and ranked by decreasing value of abundance. c.) Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plots of the 16S rRNA gene abundance matrix based on the Bray-Curtis dissimilarity (stress=0.14) illustrating the effect of the sampling site, location and season on the archaeal and bacterial composition. Multi-response permutation procedure (MRPP) was used to calculate the variable importance (A) and to test the significance (p-value) of the effect of the variables. WTD: distance to the water table; DOC: dissolved organic carbon; GA: gallic acid; Phyla < 1% abund.: phyla of which the cumulative relative abundance was less than 1% of total abundance. Top: depth of 7.5 cm; Middle: depth of 42.5 cm; Bottom: depth of 92.5 cm.



Archaeal and bacterial abundance varied with site and location but not with sampling season

We investigated the influence of site, sampling location and sampling season through non-metric multidimensional scaling (NMDS) ordination to the 16S rRNA Bray-Curtis distance matrix and further tested for the influence of each variable using multi-response permutation procedure (MRPP). Our results highlighted site, and sampling location had a significant effect on the abundance of microorganism and composition across samples (**Figure VI.2c**). Sites was the most influential factor ($C = 0.26$; $p\text{-value} = 0.001$), followed by sampling location ($C = 0.13$; $p\text{-value} = 0.003$). Interestingly, the season did not significantly influence the overall variability of 16S rRNA ($C = -0.03$; $p\text{-value} = 0.998$), even though our study includes samples collected at contrasting seasons, a rainy and cold spring, after the last snowpacks had melted, and the dry and hot summer three months after, when most of the hollows were dry (**Figure VI.2c** and **Figure VI.1**).

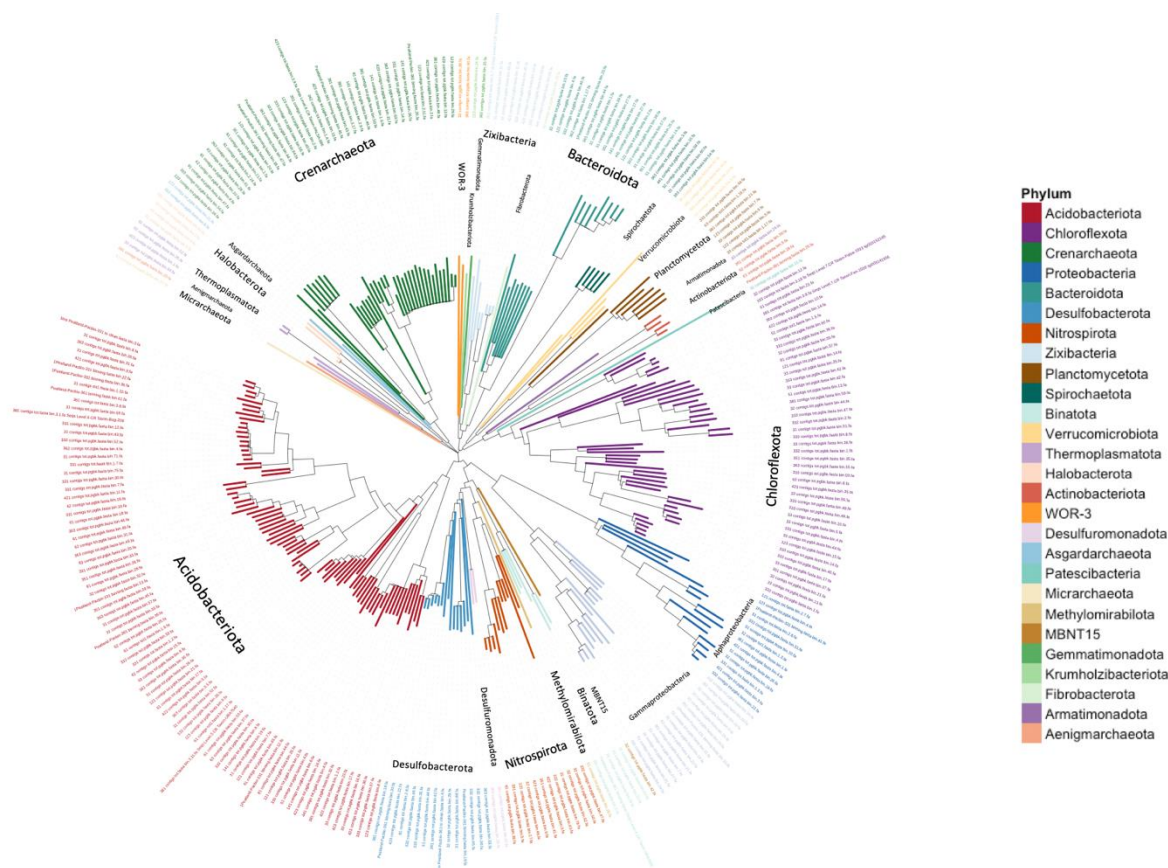
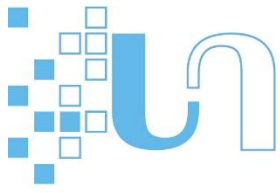


Figure VI.3. Maximum likelihood phylogenomic tree of the 290 metagenome-assembled genomes (MAGs).

Phylogenetic tree was computed using the software toolkit GTDB-tk, which uses the maximum likelihood method to classify each MAG according to its location in the reference tree, its relative evolutionary divergence and/or average nucleotide identity (ANI) with respect to the reference genomes. The tree was estimated on the basis of the concatenated phylogeny of 120 bacterial single-copy marker genes or 122 archaeal single-copy marker genes. It includes 240 bacterial genomes and 50 archaeal genomes. Colors highlight the edges of the phylum.

Peatland diversity revealed through Metagenome Assembled Genomes (MAGs)

We performed genomes reconstruction from each sample in order to link metabolic functions to specific microorganisms. We recovered a total of 515 genomic bins filtered to a completeness > 50% and a



contamination < 5 %. This include 466 MAGs from Illumina and 49 MAGs from Pacbio sequencing with a mean completeness of 80.3% and a mean contamination of 2.6%. After dereplication, 290 unique genomes were retained: 50 belonged to the Archaea domain and 240 to the Bacteria domain. Two MAGs assembled from Pacbio were not recovered in the Illumina binning. Importantly, we recovered 75 high-quality genomes (>95% estimated completeness) across 13 of the 27 archaeal and bacterial phyla detected in Bernadouze peatland (Supplementary **Supplementary data Table VI-1**). A total of 25 genomes belong to phylum whose relative abundance is less than 1% as evaluated through 16S data (**Figure VI.2b**).

To identify these MAGs, phylogenetic trees were inferred from concatenated sets of single-copy marker genes (120 bacterial or 122 archaeal genes) (**Figure VI.3a**). Of the 27 phyla found in our samples, Acidobacteriota (80), Chloroflexota (44), Crenarchaeota (38), Proteobacteria (29), Bacteroidota (16) and Desulfobacterota (14) were the ones that have been the most recovered. Some poorly characterized phyla were also recovered in Bernadouze peatland, such as CPR (Patescibacteria) and DPANN (Aenigmarchaeota, Micrarchaeota), Asagar (Lokiarchaeia) along with Armatimonadota, Binatota, Gemmatimonadota, Krumholzibacteriota, Methyloimabilota. According to GTDB classification, 99.6% of the MAGs recovered at Bernadouze were classified as new species, 43.1% as new genera and 0.1% as new families.

We estimated the average representation of MAGs in each metagenome by mapping the raw reads against the contigs of the 515 recovered MAGs. The results showed an average representation of 32.5% and 30.9% for the oligotrophic fen and bog sites respectively, while it is only of 11.6% for the eutrophic fen site. According to previous studies (Howe et al., 2014; Sharon and Banfield, 2013), we hypothesized that this fact may hold to the complexity of archaeal and bacterial communities, with communities exhibiting higher diversity being less redundant also in term of genomes. Thus, we calculate the archaeal and bacterial richness based on the abundance of 16S rRNA. We found that richness was higher in the eutrophic fen (~48.6) than in the oligotrophic condition (~42.4). The two fens exhibit higher richness than the bog (~35.8). Moreover, we found also a negative and significant correlation between richness and MAG recovery ($R^2 = -0.64$, $p > 0.001$) in Bernadouze samples (supplementary data **Supplementary data Figure VI.6a**). Taken together, these results suggested that our ability to assemble genomes decreased as the complexity (high richness and high diversity) of the community increased. Moreover, the assembly of genomes seems to reflect the archaeal and bacterial diversity of the peatland observed from the 16S rRNA results (supplementary data **Supplementary data Figure VI.6b**).

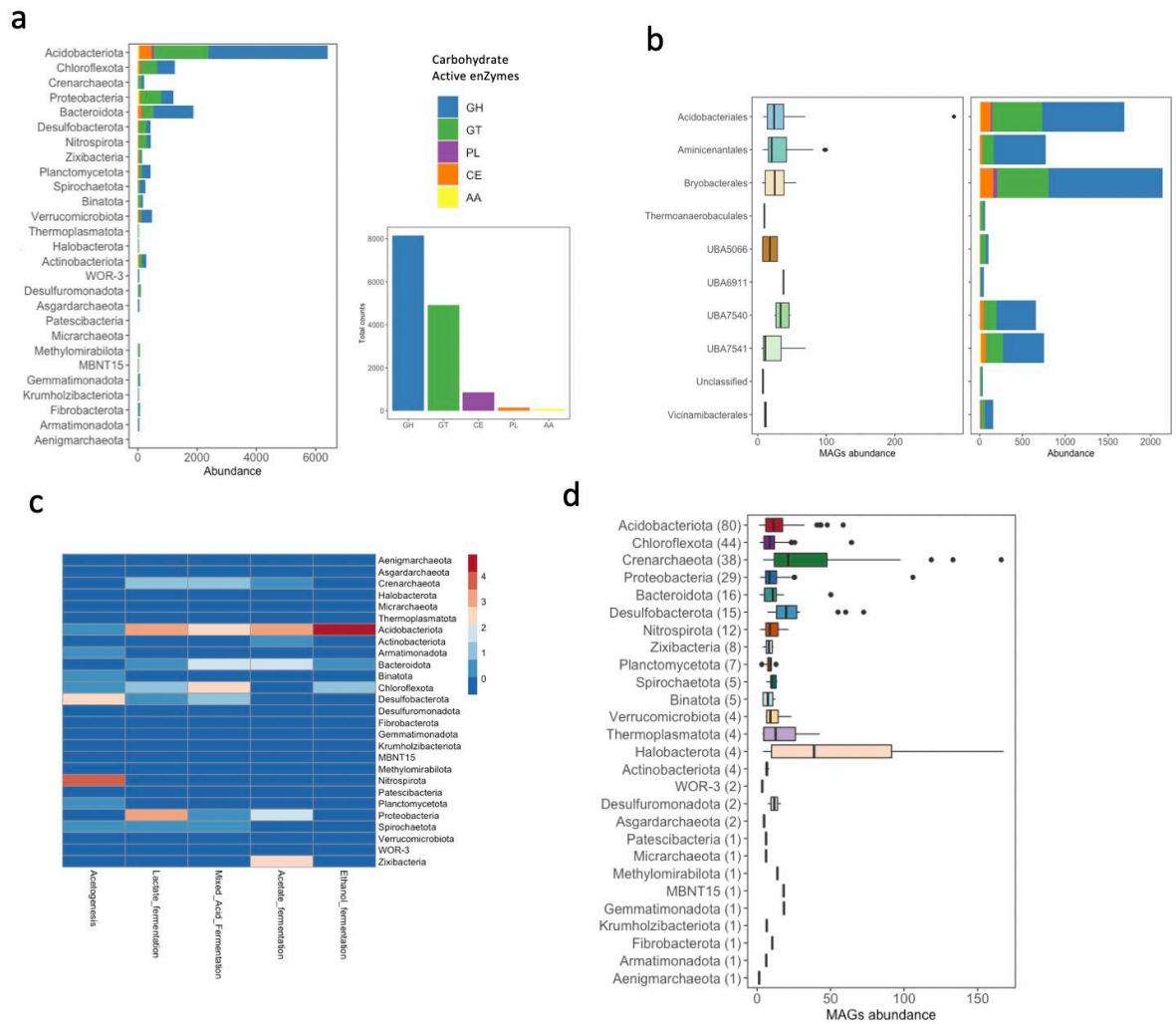
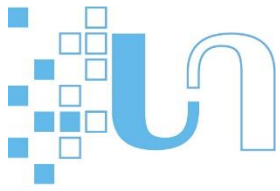
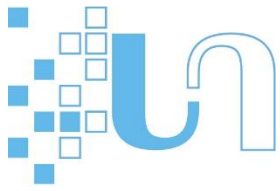


Figure VI.4. Predicted polysaccharides degradation capacity and fermentation metabolisms.

a.) Cumulative abundance per phylum of Glycoside Hydrolase (GH), Glycosyl Transferases (GT), Carbohydrate Esterases (EC), Polysaccharide Lyases (PL) and Auxiliary Activities (AA), arranged in alphabetical order, barplot shows the total abundance of the 5 subclasses of CAZY enzyme (CAZYme). b.) Abundance of Acidobacteriota at order-level estimated from recruitment values. The barplot shows the abundance of each CAZY enzyme subgroup (n=5) present in Acidobacteria, classified at the order-level. c.) Heatmap of complete fermentative pathways count predicted in the 290 MAGs at phylum-level, the data were Z-score transformed. d.) Abundance of MAGs recovered in each phylum across the 24 metagenomes.

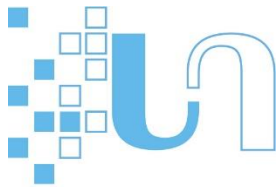


Peatland MAGs exhibit a wide range of functional genes involved in organic matter degradation

To identify the metabolic capacities involved in the degradation of plant-derived polysaccharides (cellulose and hemicellulose), we investigated the hydrolytic Carbohydrate Active enZymes (CAZymes) encoding genes distribution in the MAG pool. We used dbcan, CAZy and PPR to profile reconstructed genomes. We found that most encoding gene for CAZymes were Glycoside Hydrolase (GH, 62.9%), followed by Glycosyl Transferases (GT, 28.8%), Carbohydrate Esterases (EC, 6.8%), Polysaccharide Lyases (PL, 1.1%) and Auxiliary Activities (AA, 0.4%) (**Figure VI.4a**). On the 355 classes of CAZymes, the most prevalent genes were GT2 (8.8% of total CAZymes) and GT4 (8.1%), but the GH13 (4.4%), GH3 (4.4%), GH2 (3.9%), GH23 (3.1%), GT51 (3.0%), GT35 (2.6%), GH57 (2.3%), GH39 (2.2%), GT28 (1.7%), GH31 (1.6%), GH51 (1.5%), GH94 (1.5%) and GH130 (1.4%) were also detected. Among the Carbohydrate Esterases, CE1 (1.1%) and CE4 (1.1%) are also widely encoded.

GHs are the enzymes that catalyze the hydrolysis of glycosidic bonds predominantly of cellulose, oligosaccharides, sugar side chains, amylose/maltose and peptidoglycan (Vanwonterghem et al., 2016). GTs play a key role in oligo and polysaccharide biosynthesis pathways and protein glycosylation (Breton et al., 2006). GT2 and GT4 are involved in the formation of cell wall in various organisms including bacteria, archaea, fungi and plants (Keenleyside et al., 2001). GH13 are enzymes that contribute to the synthesis of trehalose from starch, a compound used by both plants and fungi to store carbon and energy (Howe et al., 2016). GH3, GH2, GH57, GH39, GH31 and GH51 are exo-hemicellulase enzymes involved in the last step of the hemicellulose degradation, providing xylose from xylobiose. While GH3 is also functionally predicted as β -glucosidases, an enzyme involved in the final stage of cellulose degradation to produce glucose, GH51 is also an endo-hemicellulase, producing xylose from xylan. Finally, GH3, CE1 and CE4 are debranching enzymes, catalyzing the hydrolysis of hemicellulose into xylan (Bredon et al., 2018), and GH94 is a cellobiose phosphorylase, for cellobiose utilization (Vanwonterghem et al., 2016).

Importantly we showed that in Bernadouze peatland, Acidobacteriota genomes encoded the largest number of CAZymes (45.5%), surpassing Bacteroidetes (13.3%), Chloroflexi (8.9%) and Proteobacteria (8.5%) (**Figure VI.4a**). In the Acidobacteriota phyla, Bryobacterales had the highest number of CAZy enzyme detected (33.3%), followed by Acidobacteriales (26.4%), Aminicantales (12%), UBA7541 (11.8%) and UBA7540 (10.3%) (**Figure VI.4b**). Among the 6 orders of Acidobacteriota recovered, the enzymes identified were fairly similar between each group, with 7.8% and 6.3% of the enzymes found belonging to GT2 and GT4 respectively, and many GH13 (3.3%), GH2 (4.5%), GH3 (5.2%) and GH29 (3.1%). GH23 (a lytic transglycosylase, 3.5%) were also detected. It is a new class of enzyme probably involved in the

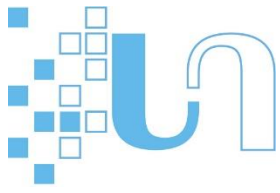


degradation of cellulose (López-Mondéjar et al., 2016). Aminicantales were the only order that have genes encoding for CAZymes different from other Acidobacteriota and most of them have not been frequently detected in the environment. While GH116 (2.9%) are identified as exo-hemicellulases involved in the degradation of exo-hemicellulase (Bredon et al., 2018), GH106 (α -L-rhamnosidases, 4.7%), GH127 (β -L-arabinofuranosidase, 4.0%), GH38 (α -mannosidase, 5.7%) have an unknown function in the environment (Cobucci-Ponzano et al., 2010; Mensitieri et al., 2018; Tasuku, 2014).

Insight into the peatland MAGs involved in fermentation processes

The Bernadouze peatland was similarly waterlogged in spring and in summer at the time of sampling (water table depth at -12.5 cm on average) in accordance with previous observations made in other peatlands (Joosten and Clarke, 2002). Thus, anoxic conditions prevailed in the peatland, in the same range of depth and irrespective of the season. Mineralization of organic matter was supposed to primarily occur there via fermentation and methanogenesis (Westermann, 1993), two processes known to be favored under anoxic and nutrient-poor conditions (McInerney and Bryant, 1981). We first analyzed the potential of fermentation in the Bernadouze peatland MAGs. Under anaerobic conditions, the monomers produced from the hydrolysis of polysaccharides, were mainly fermented into organic acids such as ethanol, acetate and lactate, low molecular weight alcohols, dihydrogen (H₂) and CO₂ (Magonigal et al., 2004). The main fermentation pathways (i.e. lactate, acetate, ethanol, mixed acid fermentation, propionate and butyrate) that could be employed by MAGs have been reconstructed (**Figure VI.4c**), including acetogenesis (anaerobic pathway reducing CO₂ during the oxidation of H₂ to form acetate).

Lactic acid fermentation was found in 40% of the overall MAGs and present in 19 of the 27 phyla, indicating functional redundancy (i.e. overlap in the metabolic capacities of different species) and suggesting that lactic acid was one of the most important intermediates in the peatland. Lactic acid fermentation was found in Acidobacteriota (24.1%) and Proteobacteria (24.1%), as well as in Crenarchaeota (12.1%), Chloroflexota (9.5%) and Bacteroidota (6.9%). It has also been identified as a common permafrost metabolism in Stordalen where it is encoded mainly by Acidobacteria and Actinobacteria and particularly abundant in bog surface layers (Woodcroft et al., 2018). In fact, this metabolic function has been identified in Chloroflexi, Bacteroidetes and Proteobacteria (Woodcroft et al., 2018). Mixed acid fermentation was also commonly recovered in MAGs at Bernadouze (24.5%), encoded by 15 phyla in particular Acidobacteriota (19.7%), Chloroflexota (18.3%), Bacteroidota (14.1%), Crenarchaeota (11.3%), and Desulfobacterota (9.9%). This metabolic pathway produces acetate, ethanol, formate, H₂/CO₂, and

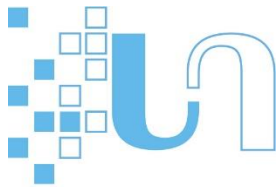


lactate from different saccharides (e.g. glucose, cellobiose, cellulose) and can provide substrate for CH₄ mineralization in co-culture (Penning and Conrad, 2006). Acetate fermentation was detected in 11 phylum, and identified in 10% of the MAGs. It was mainly found in large proportion in Acidobacteriota (24.1%), followed by Zixibacteria (17.2%), Proteobacteria (13.8%) and Bacteroidota (13.8%). A smaller fraction of Bernadouze genomes are capable of alcoholic fermentation and acetogenesis and encoded by 6 and 8 phyla respectively. The prevalence of these processes was also found in lower abundance (9.3% and 4.8% respectively). Ethanol production is almost exclusively detected in Acidobacteriota (66.7%) and to a lesser extent in Chloroflexota (14.8%) and Bacteroidota (7.4%). Acetogenesis was mainly found in Nitrospirota (37.5%) and Desulfobacterota (21.4%). Generally, acetate production from CO₂ preferentially observed at near neutral pH (Horn et al., 2003; Ye et al., 2012), and was found in fen in Ignavibacteriae, Bacteroidetes and Verrucomicrobia and in bog in Acidobacteria, Actinobacteria and Verrucomicrobia (Woodcroft et al., 2018). The complete fermentation pathway for butyrate and propionate was not recovered among the 290 MAGs, but 14.8% of the genomes encoded the butyrate kinase gene (*buk*, the key gene for butyrate production), 3.1% encoded the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene (*but*, the key gene of the alternative pathway for butyrate production) and 6.6% owned the 3 key genes involved in propionate production methylmalonyl CoA carboxytransferase, methylmalonyl CoA mutase (*MUT*), methylmalonyl CoA epimerase (*MCEE*, *epi*).

Insight into MAGs involved in methane metabolism at Bernadouze

Methanogenesis is the final step in the anaerobic degradation of organic carbon, taking place after more favorable terminal electron acceptors (TEAs) have been depleted. In freshwater peatland, it has been suggested that methane was mostly produced by the hydrogenotrophic methanogenesis (i.e. CO₂ reduction by H₂) and acetoclastic methanogenesis (i.e. acetate disproportionation to CO₂ and CH₄) (Lai, 2009). In the Bernadouze metagenomes, 4 MAGs encoded the methyl coenzyme-M reductase complex, half belonging to the newly described order Bog-38 and the other half to Methanomicrobiales. GTDB phylogenetic reconstruction revealed that Bog-38 is a sister clade to a group formed by Methanomicrobia and Methanosarcinia (**Supplementary data Figure VI.7**).

Based on the recruitment values, methanogens were the most abundant group in Bernadouze peatland (**Figure VI.4d**) and in particular one of the Bog-38 MAGs we reconstructed which had the highest cumulative relative abundance (338 RPKG) (supplementary table 1), 10 times higher than the average relative abundance of MAGs recovered (33 RPKG). Members of Methanomicrobiales were much less abundant (average 19 RPKG). The methanogens assembled at Bernadouze were hydrogenotrophic



methanogens, using *fwdABCD* or *cdhABCDE* complex to reduce CO₂. Considering the presence of acetyl-CoA synthetase (AMP-forming), which allows acetate activation (Evans et al., 2019), we could determine that the two Bog-38 members were also acetoclastic methanogens. Moreover, this lineage showed alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase genes, allowing them to produce acetate as substrate for methanogenesis. Lactate dehydrogenase was exclusively present in Methanomicrobiales methanogens which have aminopeptidases and amidohydrolase genes, suggesting that peptides could be used as substrate for fermentation (Duong et al., 2019).

These results are consistent with previous studies, reporting that Methanomicrobiales and, to a lesser extent, members of hydrogenotrophic Methanobacteria and acetoclastic Methanosarcinales are important contributors to CH₄ production in peatlands (Cadillo-Quiroz et al., 2006; Juottonen et al., 2005; Lin et al., 2012; Martini et al., 2006). Two MAGs from Alphaproteobacteria and Binatia encoding for the Pmo/AmoABC complex were also identified at Bernadouze, suggesting that these methanotrophs could oxidize a proportion of the CH₄ produces, limiting the release to the atmosphere.

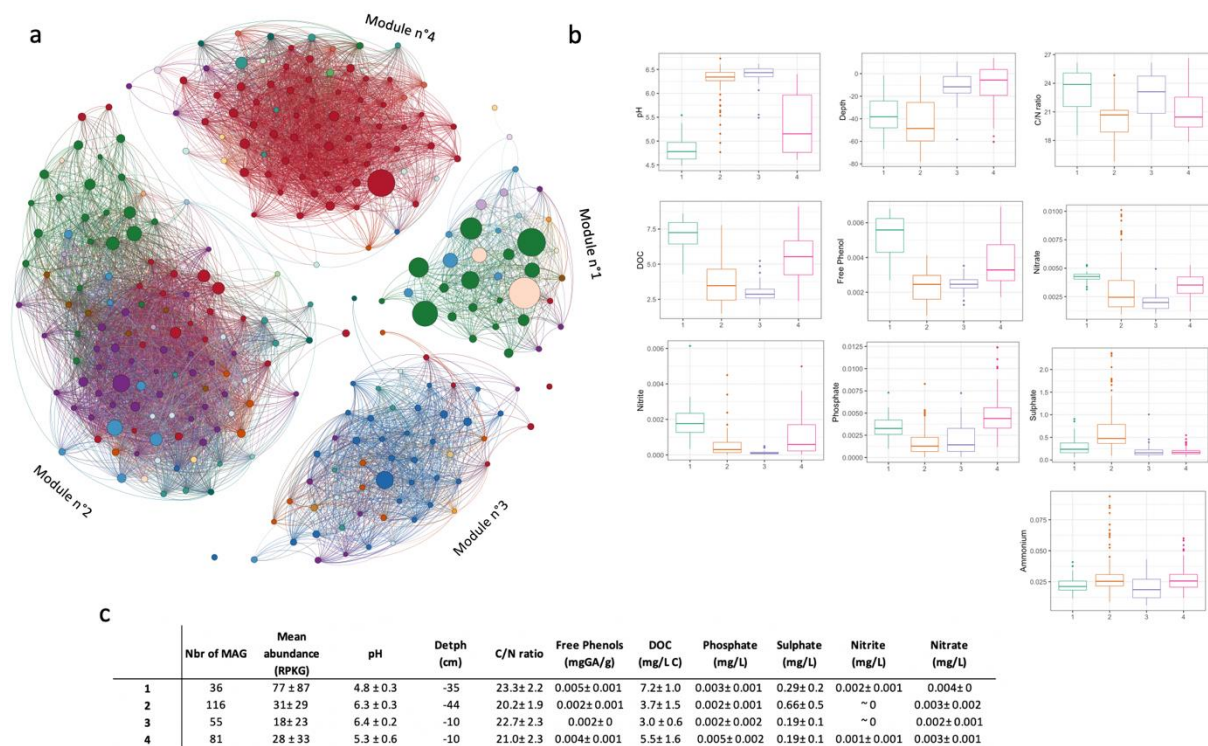


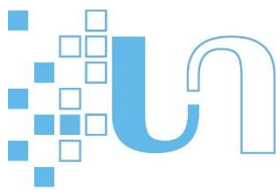
Figure VI.5. Co-occurrence MAGs network based on Spearman correlations.

a.) Nodes represent MAGs and edges represent significant Spearman correlations between MAG abundances (coefficient > 0.6, p-value value < 0.001). The size of the nodes is proportional to the cumulative abundance of the MAGs across the 24 metagenomes and colors represent MAG taxonomic affiliation. b.) Boxplot representing the weighted mean of each MAG over the 24 samples as a function of pH, depth, C/N ratio, free phenols and nutrients. c. Characteristic for each module, the values indicated for pH, depth, C/N ratio, free phenols, DOC, phosphates, sulfate, nitrite, nitrate are averaged per module with standard deviation.

Co-occurrence patterns and environmental preferences of the peatland archaeal and bacterial communities.

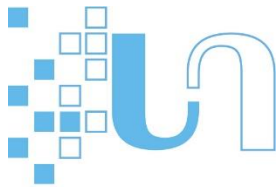
We generated a co-occurrence network (based on recruitment values of the MAGs) to infer ecological associations between MAGs of the peatland microbial communities. Then, we tested statistically whether the assignments of the MAGs to modules were congruent with the environmental preferences.

The network analysis distinguished 6 modules, 2 of which were composed of a single MAG and subsequently excluded from the study (**Figure VI.5a**). The node number and the node composition differed



between the 4 meaningful modules. Module 1, the smallest in the network (36 nodes) concentrated almost all the most abundant nodes (77 ± 87 RPKG). Most of the prevalent nodes were distributed in two phyla, namely Crenarchaeota and Desulfobacterota (44 % and 17% of the total node number in the module 1, respectively). Interestingly, Bog-38 and Thermoplasmatota were each represented by only 2 nodes with outstanding abundances (236 RPKG and 58 RPKG in average, respectively). Module 2 contained the largest number of nodes (116) with lower abundances compared to the first module (31 ± 29 RPKG). The corresponding MAGs were spread in distinct phylogenetic lineages: Acidobacteriota (16%), Chloroflexota (28%), Crenarchaeota (18%), Desulfobacterota (7%), Bacteroidota (6%), Planctomycetota (5%), Zixibacteria (5%), Nitrospirota (3%), and Methanomicrobia (2%). Module 3 was made of 55 nodes which exhibit the lowest mean abundances (18 ± 23 RPKG) compared to the other modules. It clustered MAGs belonging mainly to Alphaproteobacteria (22%), Gammaproteobacteria (25%), Nitrospirota (13%), Chloroflexota (11%), Bacteroidota (7%). Finally, module 4 included 81 nodes with an average abundance of 28 ± 33 RPKG. Most of the nodes corresponded to MAGs affiliated to Acidobacteriota (69%) and to a lesser extent to Bacteroidota (6%) and to Binatota (5%) (**Figure VI.5ac**).

We then determined the average geochemical parameters for each module, based on the distribution of the MAGs (**Figure VI.5b**). We found that MAGs associated within module had preferences for similar environmental conditions. In ascending order of the importance values (see method), environmental variables predictive of the modules were: the pH (0.161), the depth (0.216), the nutrients (0.045), the C/N ratio (0.0565), the free phenols (0.078) and the DOC (0.071). The MAGs included in module 1 were more abundant at low pH (4.8 ± 0.3), at -35 cm (below the water table), under high concentrations of phenols (0.005 ± 0.001 mg_{GA}/g), phosphate (0.003 ± 0.001 mg/L), nitrite (0.002 ± 0.001 mg/L), nitrate (0.004 mg/L) and DOC (7.2 ± 1 mg/L C). In addition, the C/N ratio associated to module 1 was high (23.3 ± 2.2). The MAGs belonging to module 2 were more abundant at near neutral pH (6.3 ± 0.3), at -44 cm, under low C/N ratio (20.2 ± 1.9) and under high concentrations of sulphate (0.66 ± 0.5 mg/L) and ammonium (0.03 ± 0.2 mg/L). The MAGs forming module 3 were more abundant at near neutral pH as well (6.4 ± 0.2) but above the water table (-10 cm), under high C/N ratio (22.7 ± 2.3) and under low concentrations of nutrients, DOC and free phenols (Fig.5b). The MAGs gathered in module 4 were more abundant at a rather acid pH (5.3 ± 0.6), above the water table as well (-10 cm), under a low C/N ratio (21.0 ± 2.3) and rather high concentrations of free phenols (0.004 ± 0.001 mg_{GA}/g), as well as phosphate (0.005 ± 0.002 mg/L), nitrite (0.001 ± 0.001 mg/L), nitrate (0.003 ± 0.001 mg/L) and DOC (5.5 ± 1.6 mg/L C).

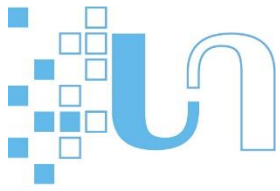


Overview of the Bernadouze community functionality

A small number of phyla was found associated to acidic pH (**Figure VI.5a**). Mainly belonging to Acidobacteriota (module 4), this supports the previous finding that low pH limits the number of dominant lineages (Hunger et al., 2015). Primarily recovered close to the surface, they encode for the major part of the enzymes involved in the breakdown of high-molecular-weight plant-derived polysaccharides, potentially leading to a higher activity of degradation of organic matter in the bog. These results highlight the key role of Acidobacteriota in the functioning of these ecosystems, and drive the mineralization of organic matter in peatlands as also reported in various other environments (Diamond et al., 2019; Woodcroft et al., 2018).

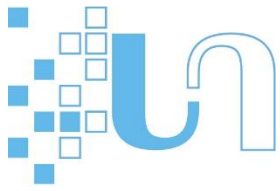
Fermentation pathways are recurrent metabolisms at Bernadouze (**Figure VI.4c**). Lactate fermentation was the most widespread and commonly found in the high abundant phyla recovered. Lactate can provide substrate for sulphate reducers (Muyzer and Stams, 2008), which play a major role in the organic carbon recycling in peatland, and can represent up to 30% of the global diversity (Hines et al., 1999; Pester et al., 2012; Rooney-Varga et al., 1997). This is consistent with the high abundance of Desulfobacterota found in the Bernadouze (**Figure VI.4d**), which represent the major clade of sulphate-reducing bacteria (Müller et al., 2015; Waite et al., 2020). Moreover, lactate could also provide substrate to acetoclastic methanogenesis or to hydrogenotrophic methanogenesis via acetogenesis in experimental conditions (Detman et al., 2018).

Acetate and mixed acid fermentation are also abundant metabolic pathways in the peatland, providing acetate and H_2-CO_2 , these compounds drive methanogenesis in peat (Abbanat et al., 1989; Bräuer et al., 2004; Lai, 2009; Wüst et al., 2009). Strongly prevalent in Acidobacteriota, Crenarchaeota and Desulfobacteria, they are the dominant phylum under acidic conditions, above and below the water table (**Figure VI.5a, Figure VI.4cd**). This is consistent with the high abundance of methanogens and Bog-38 (module 1) in the acidic part of the peatland. The low abundance of Methanomicrobia at pH close to neutral can be explained by the presence of acetogenic Nitrospira, exclusively found in the fen, which can outcompete methanogen in these conditions (Deppe et al., 2010; Hunger et al., 2011).



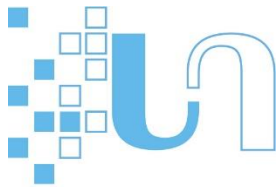
VI.4. CONCLUSION

Here, shotgun metagenomic sequencing without PCR amplification was employed to investigate 24 samples from a Pyrenean peatland. Analysis of 16S rRNA revealed high microbial diversity, with 76 distinct phylas identified. We performed a genome-centric approach, and we successfully assembled 290 unique genomes belonging to 27 phylum, including 25 MAGs from poorly represented phyla. To our knowledge, only few genomes have been assembled from peatland environments (Carson et al., 2019; Hausmann et al., 2018), and the metagenomic surveys were limited (Graham et al., 2019; Martí et al., 2019; St. James et al., 2021). According to the GTDB classification, more than 99% of the MAGs had never been previously isolated, highlighting the lack of knowledge about microbes from these ecosystems, which play a key role in the carbon cycle. We identified the major part of the hydrolase enzymes in the Acidobacteriota groups, certainly driving the mineralization of organic matter at acidic pH. Finally, a lineage of very abundant methanogenic archaea was identified, suggesting that methanogenesis could be an important process in the Bernadouze peatland.

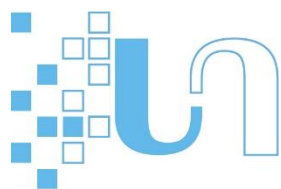


VI.5. REFERENCES

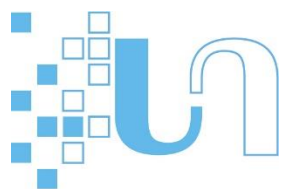
- Abbanat, D.R., Aceti, D.J., Baron, S.F., Terlesky, K.C., Ferry, J.C., 1989. Microbiology and biochemistry of the methanogenic archaeobacteria. *Adv. Space Res.* 9, 101–105. [https://doi.org/10.1016/0273-1177\(89\)90215-9](https://doi.org/10.1016/0273-1177(89)90215-9)
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs 14.
- Andersen, R., Chapman, S.J., Artz, R.R.E., 2013. Microbial communities in natural and disturbed peatlands: A review. *Soil Biol. Biochem.* 57, 979–994. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.10.003>
- Arai, H., Hadi, A., Darung, U., Limin, S.H., Takahashi, H., Hatano, R., Inubushi, K., 2014. Land use change affects microbial biomass and fluxes of carbon dioxide and nitrous oxide in tropical peatlands. *Soil Sci. Plant Nutr.* 60, 423–434. <https://doi.org/10.1080/00380768.2014.903576>
- Bastian, M., Heymann, S., Jacomy, M., 2009. Gephi : An Open Source Software for Exploring and Manipulating Networks 2.
- Belyea, L.R., 1996. Separating the Effects of Litter Quality and Microenvironment on Decomposition Rates in a Patterned Peatland. *Oikos* 77, 529. <https://doi.org/10.2307/3545942>
- Bragazza, L., Siffi, C., Iacumin, P., Gerdol, R., 2007. Mass loss and nutrient release during litter decay in peatland: The role of microbial adaptability to litter chemistry. *Soil Biol. Biochem.* 39, 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.07.014>
- Bräuer, S.L., Yavitt, J.B., Zinder, S.H., 2004. Methanogenesis in McLean Bog, an Acidic Peat Bog in Upstate New York: Stimulation by H₂/CO₂ in the Presence of Rifampicin, or by Low Concentrations of Acetate. *Geomicrobiol. J.* 21, 433–443. <https://doi.org/10.1080/01490450490505400>
- Bredon, M., Dittmer, J., Noël, C., Moumen, B., Bouchon, D., 2018. Lignocellulose degradation at the holobiont level: teamwork in a keystone soil invertebrate. *Microbiome* 6, 162. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0536-y>
- Breton, C., Šnajdrová, L., Jeanneau, C., Koča, J., Imberty, A., 2006. Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology* 16, 29R–37R. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwj016>
- Bridgham, S.D., Richardson, C.J., 2002. Endogenous versus exogenous nutrient control over decomposition and mineralization in North Carolina peatlands 28.
- Brown, C.T., Hug, L.A., Thomas, B.C., Sharon, I., Castelle, C.J., Singh, A., Wilkins, M.J., Wrighton, K.C., Williams, K.H., Banfield, J.F., 2015. Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria 18.
- Buchfink, B., Xie, C., Huson, D.H., 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat. Methods* 12, 59–60. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>
- Busk, P.K., Pilgaard, B., Lezyk, M.J., Meyer, A.S., Lange, L., 2017. Homology to peptide pattern for annotation of carbohydrate-active enzymes and prediction of function 9.
- Cadillo-Quiroz, H., Brauer, S., Yashiro, E., Sun, C., Yavitt, J., Zinder, S., 2006. Vertical profiles of methanogenesis and methanogens in two contrasting acidic peatlands in central New York State, USA. *Environ. Microbiol.* 8, 1428–1440. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01036.x>
- Carson, M.A., Bräuer, S., Basiliko, N., 2019. Enrichment of peat yields novel methanogens: approaches for obtaining uncultured organisms in the age of rapid sequencing. *FEMS Microbiol. Ecol.* 95. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz001>



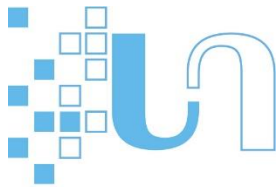
- Castelle, C.J., Banfield, J.F., 2018. Major New Microbial Groups Expand Diversity and Alter our Understanding of the Tree of Life. *Cell* 172, 1181–1197. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.016>
- Chaumeil, P.-A., Mussig, A.J., Hugenholtz, P., Parks, D.H., 2019. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. *Bioinformatics* btz848. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz848>
- Clauset, A.; Newman, M. E. J. & Moore, C. Finding community structure in very large networks, *Physical Review E* 2004, 70, 066111
- Clymo, R.S., Turunen, J., Tolonen, K., 1998. Carbon Accumulation in Peatland. *Oikos* 81, 368. <https://doi.org/10.2307/3547057>
- Csardi G, Nepusz T: The igraph software package for complex network research, *InterJournal, Complex Systems* 1695. 2006. <https://igraph.org>
- Cobucci-Ponzano, B., Conte, F., Strazzulli, A., Capasso, C., Fiume, I., Pocsfalvi, G., Rossi, M., Moracci, M., 2010. The molecular characterization of a novel GH38 α -mannosidase from the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* revealed its ability in de-mannosylating glycoproteins 13.
- Dedysh, S.N., 2011. Cultivating Uncultured Bacteria from Northern Wetlands: Knowledge Gained and Remaining Gaps. *Front. Microbiol.* 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00184>
- Deppe, M., Knorr, K.-H., McKnight, D.M., Blodau, C., 2010. Effects of short-term drying and irrigation on CO₂ and CH₄ production and emission from mesocosms of a northern bog and an alpine fen. *Biogeochemistry* 100, 89–103. <https://doi.org/10.1007/s10533-010-9406-9>
- Detman, A., Mielecki, D., Pleśniak, Ł., Bucha, M., Janiga, M., Matyasik, I., Chojnacka, A., Jędrysek, M.-O., Błaszczak, M.K., Sikora, A., 2018. Methane-yielding microbial communities processing lactate-rich substrates: a piece of the anaerobic digestion puzzle. *Biotechnol. Biofuels* 11, 116. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1106-z>
- Diamond, S., Andeer, P.F., Li, Z., Crits-Christoph, A., Burstein, D., Anantharaman, K., R. Lane, K., Thomas, B.C., Pan, C., Northen, T.R., Banfield, J.F., 2019. Mediterranean grassland soil C–N compound turnover is dependent on rainfall and depth, and is mediated by genomically divergent microorganisms. *Nat. Microbiol.* 4, 16.
- Duong, T.H., Grolle, K., Nga, T.T.V., Zeeman, G., Temmink, H., van Eekert, M., 2019. Protein hydrolysis and fermentation under methanogenic and acidifying conditions. *Biotechnol. Biofuels* 12, 254. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1592-7>
- Eddy, S.R., 1998. Profile hidden Markov models. *Bioinformatics* 14, 755–763. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/14.9.755>
- Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461.
- Evans, P. N., Parks, D. H., Chadwick, G. L., Robbins, S. J., Orphan, V. J., Golding, S. D., Tyson G. W. 2015, Methane metabolism in the archaeal phylum Bathyarchaeota revealed by genome-centric metagenomics. *Science* 350, 434-438. <https://doi.org/10.1126/science.aac7745>
- Evans, P.N., Boyd, J.A., Leu, A.O., Woodcroft, B.J., Parks, D.H., Hugenholtz, P., Tyson, G.W., 2019. An evolving view of methane metabolism in the Archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 219–232. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0136-7>
- Gorham, E., 1991. Northern Peatlands: Role in the Carbon Cycle and Probable Responses to Climatic Warming. *Ecol. Appl.* 1, 182–195. <https://doi.org/10.2307/1941811>



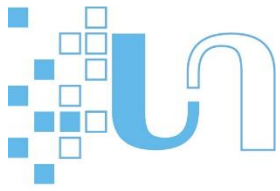
- Graham, E.B., Yang, F., Bell, S., Hofmockel, K.S., 2019. High Genetic Potential for Proteolytic Decomposition in Northern Peatland Ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 85, 12.
- Haegeman B, Hamelin J, Moriarty J, Neal P, Dushoff J & Weitz JS (2013) Robust estimation of microbial diversity in theory and in practice. *ISME J* 7: 1092-1101.
- Hausmann, B., Pelikan, C., Herbold, C.W., Köstlbacher, S., Albertsen, M., Eichorst, S.A., Glavina del Rio, T., Huemer, M., Nielsen, P.H., Rattei, T., Stingl, U., Tringe, S.G., Trojan, D., Wentrup, C., Woebken, D., Pester, M., Loy, A., 2018. Peatland Acidobacteria with a dissimilatory sulfur metabolism. *ISME J.* 12, 1729–1742. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0077-1>
- Hines, M.E., Evans, R.S., Sharak Genthner, B.R., Willis, S.G., Friedman, S., Rooney-Varga, J.N., Devereux, R., 1999. Molecular Phylogenetic and Biogeochemical Studies of Sulfate-Reducing Bacteria in the Rhizosphere of *Spartina alterniflora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2209–2216. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.5.2209-2216.1999>
- Horn, M.A., Matthies, C., Küsel, K., Schramm, A., Drake, H.L., 2003. Hydrogenotrophic Methanogenesis by Moderately Acid-Tolerant Methanogens of a Methane-Emitting Acidic Peat. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 74–83. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.74-83.2003>
- Howe, A., Yang, F., Williams, R.J., Meyer, F., Hofmockel, K.S., 2016. Identification of the Core Set of Carbon-Associated Genes in a Bioenergy Grassland Soil. *PLOS ONE* 11, e0166578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166578>
- Howe, A.C., Jansson, J.K., Malfatti, S.A., Tringe, S.G., Tiedje, J.M., Brown, C.T., 2014. Tackling soil diversity with the assembly of large, complex metagenomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 4904–4909. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402564111>
- Hunger, S., Gößner, A.S., Drake, H.L., 2015. Anaerobic trophic interactions of contrasting methane-emitting mire soils: processes versus taxa. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91. <https://doi.org/10.1093/femsec/fivo45>
- Hunger, S., Schmidt, O., Hilgarth, M., Horn, M.A., Kolb, S., Conrad, R., Drake, H.L., 2011. Competing Formate- and Carbon Dioxide-Utilizing Prokaryotes in an Anoxic Methane-Emitting Fen Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3773–3785. <https://doi.org/10.1128/AEM.00282-11>
- Jalut, G., Delibrias, G., Dagnac, J., Mardones, M., 1982. A PALAEOECOLOGICAL APPROACH TO THE LAST 21 000 YEARS IN THE PYRENEES: THE PEAT BOG OF FREYCHINEDE (ALT. 1350 m, ARIEGE, SOUTH FRANCE) 33.
- Joosten, H., Clarke, D., 2002. Wise use of mires and peatlands: background and principles including a framework for decision-making. International Peat Society ; International Mire Conservation Group, [Jyväskylä] : [Greifswald].
- Ju, F., Xia, Y., Guo, F., Wang, Z., & Zhang, T. (2014). Taxonomic relatedness shapes bacterial assembly in activated sludge of globally distributed wastewater treatment plants. *Environmental microbiology*, 16(8), 2421-2432.
- Juottonen, H., Galand, P.E., Tuittila, E.-S., Laine, J., Fritze, H., Yrjala, K., 2005. Methanogen communities and Bacteria along an ecohydrological gradient in a northern raised bog complex. *Environ. Microbiol.* 7, 1547–1557. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00838.x>
- Kang, D.D., Li, F., Kirton, E., Thomas, A., Egan, R., An, H., Wang, Z., 2019. MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies. *PeerJ* 7, e7359. <https://doi.org/10.7717/peerj.7359>



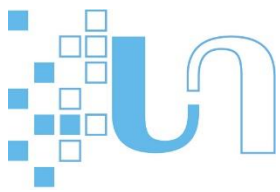
- Keenleyside, W.J., Clarke, A.J., Whitfield, C., 2001. Identification of Residues Involved in Catalytic Activity of the Inverting Glycosyl Transferase WbbE from *Salmonella enterica* Serovar Borreze. *J. Bacteriol.* 183, 77–85. <https://doi.org/10.1128/JB.183.1.77-85.2001>
- Lai, D.Y.F., 2009. Methane Dynamics in Northern Peatlands: A Review 13.
- Liaw, A. and Wiener, M. (2002). Classification and Regression by randomForest. *R News* 2(3), 18--22.
- Lin, X., Green, S., Tfaily, M.M., Prakash, O., Konstantinidis, K.T., Corbett, J.E., Chanton, J.P., Cooper, W.T., Kostka, J.E., 2012. Microbial Community Structure and Activity Linked to Contrasting Biogeochemical Gradients in Bog and Fen Environments of the Glacial Lake Agassiz Peatland. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7023–7031. <https://doi.org/10.1128/AEM.01750-12>
- López-Mondéjar, R., Zühlke, D., Becher, D., Riedel, K., Baldrian, P., 2016. Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems. *Sci. Rep.* 6, 25279. <https://doi.org/10.1038/srep25279>
- Martí, M., Eiler, A., Buck, M., Bertilsson, S., Al-Soud, W.A., Sørensen, S., Nilsson, M.B., Svensson, B.H., 2019. Effects of long-term warming and enhanced nitrogen and sulfur deposition on microbial communities in a boreal peatland (preprint). *Microbiology*. <https://doi.org/10.1101/704411>
- Martini, I.P., Martínez Cortizas, A., Chesworth, W., 2006. Peatlands - Evolution and Records of Environmental and Climate Changes, *Developments in Earth Surface Processes*. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0928-2025\(06\)X0900-8](https://doi.org/10.1016/S0928-2025(06)X0900-8)
- Megonigal, J.P., Hines, M.E., Visscher, P.T., 2004. 8.08 Anaerobic Metabolism: Linkages to Trace Gases and Aerobic Processes 108.
- Mensitieri, F., De Lise, F., Strazzulli, A., Moracci, M., Notomista, E., Cafaro, V., Bedini, E., Sazinsky, M.H., Trifuoggi, M., Di Donato, A., Izzo, V., 2018. Structural and functional insights into RHA-P, a bacterial GH106 α -L-rhamnosidase from *Novosphingobium* sp. PP1Y. *Arch. Biochem. Biophys.* 11.
- Müller, A.L., Kjeldsen, K.U., Rattei, T., Pester, M., Loy, A., 2015. Phylogenetic and environmental diversity of DsrAB-type dissimilatory (bi)sulfite reductases. *ISME J.* 9, 1152–1165. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.208>
- Muyzer, G., Stams, A.J.M., 2008. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 441–454. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1892>
- Nawrocki, E.P., Eddy, S.R., 2010. ssu-align: a tool for structural alignment of SSU rRNA sequences.
- Newman, M.E.J., 2003. The Structure and Function of Complex Networks. *SIAM Rev.* 45, 167–256. <https://doi.org/10.1137/S003614450342480>
- Peng, Y., Leung, H.C.M., Yiu, S.M., Chin, F.Y.L., 2012. IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics* 28, 1420–1428. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts174>
- Penning, H., Conrad, R., 2006. Carbon isotope effects associated with mixed-acid fermentation of saccharides by *Clostridium papyrosolvens*. *Geochim. Cosmochim. Acta* 70, 2283–2297. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2006.01.017>
- Pester, M., Knorr, K.-H., Friedrich, Michael W., Wagner, M., Loy, A., 2012. Sulfate-reducing microorganisms in wetlands – fameless actors in carbon cycling and climate change. *Front. Microbiol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00072>



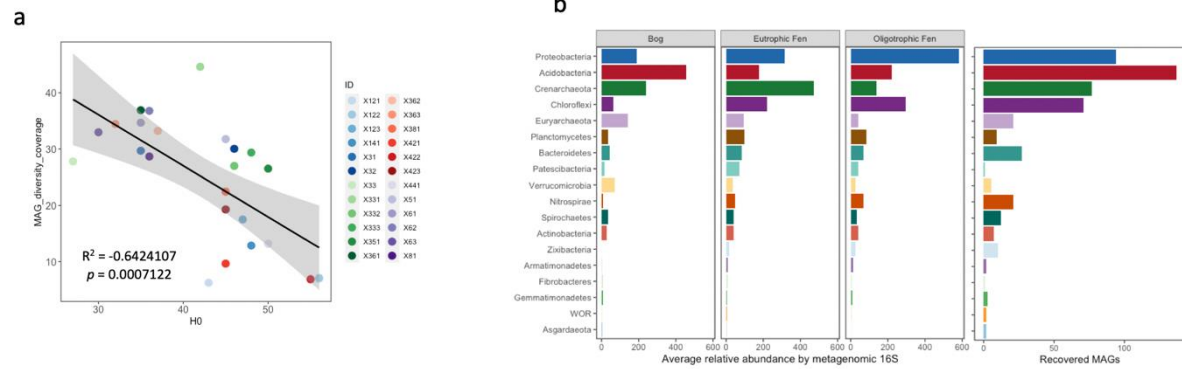
- Poepplau, C., Don, A., 2013. Sensitivity of soil organic carbon stocks and fractions to different land-use changes across Europe. *Geoderma* 192, 189–201. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2012.08.003>
- Preston, M.D., Smemo, K.A., McLaughlin, J.W., Basiliko, N., 2012. Peatland Microbial Communities and Decomposition Processes in the James Bay Lowlands, Canada. *Front. Microbiol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00070>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–D596.
- Reille, M., 1990. Recherches pollenanalytiques dans l'extrémité orientale des Pyrénées : données nouvelles, de la fin du Glaciaire à l'Actuel. *Ecol. Mediterr.* 16, 317–357. <https://doi.org/10.3406/ecmed.1990.1673>
- Rice, P., 2000. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite 2.
- Rooney-Varga, J.N., Devereux, R., Evans, R.S., Hines, M.E., 1997. Seasonal changes in the relative abundance of uncultivated sulfate-reducing bacteria in a salt marsh sediment and in the rhizosphere of *Spartina alterniflora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3895–3901. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.10.3895-3901.1997>
- Sainju, U.M., Jabro, J.D., Stevens, W.B., 2008. Soil Carbon Dioxide Emission and Carbon Content as Affected by Irrigation, Tillage, Cropping System, and Nitrogen Fertilization. *J. Environ. Qual.* 37, 98–106. <https://doi.org/10.2134/jeq2006.0392>
- Seward, J., Carson, M.A., Lamit, L.J., Basiliko, N., Yavitt, J.B., Lilleskov, E., Schadt, C.W., Smith, D.S., McLaughlin, J., Mykytczuk, N., Willims-Johnson, S., Roulet, N., Moore, T., Harris, L., Bräuer, S., 2020. Peatland Microbial Community Composition Is Driven by a Natural Climate Gradient. *Microb. Ecol.* 80, 593–602. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01510-z>
- Sharon, I., Banfield, J.F., 2013. Genomes from Metagenomics. *Science* 342, 1057–1058. <https://doi.org/10.1126/science.1247023>
- Sjögersten, S., Cheesman, A.W., Lopez, O., Turner, B.L., 2011. Biogeochemical processes along a nutrient gradient in a tropical ombrotrophic peatland. *Biogeochemistry* 104, 147–163. <https://doi.org/10.1007/s10533-010-9493-7>
- St. James, A.R., Lin, J., Richardson, R.E., 2021. Relationship Between Peat Type and Microbial Ecology in Sphagnum-Containing Peatlands of the Adirondack Mountains, NY, USA. *Microb. Ecol.* <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01651-1>
- Tasuku, I., 2014. Trends in Glycoscience and Glycotechnology 26(151): 131-140 (2014) 10.
- Vanwonterghem, I., Jensen, P.D., Rabaey, K., Tyson, G.W., 2016. Genome-centric resolution of microbial diversity, metabolism and interactions in anaerobic digestion: Genome-centric resolution through deep metagenomics. *Environ. Microbiol.* 18, 3144–3158. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13382>
- Waite, D.W., Chuvochina, M., Pelikan, C., Parks, D.H., Yilmaz, P., Wagner, M., Loy, A., Naganuma, T., Nakai, R., Whitman, W.B., Hahn, M.W., Kuever, J., Hugenholtz, P., 2020. Proposal to reclassify the proteobacterial classes Deltaproteobacteria and Oligoflexia, and the phylum Thermodesulfobacteria into four phyla reflecting major functional capabilities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70, 5972–6016. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004213>



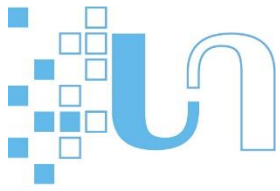
- Woodcroft, B.J., Singleton, C.M., Boyd, J.A., Evans, P.N., Emerson, J.B., Zayed, A.A.F., Hoelzle, R.D., Lamberton, T.O., McCalley, C.K., Hodgkins, S.B., Wilson, R.M., Purvine, S.O., Nicora, C.D., Li, C., Frolking, S., Chanton, J.P., Crill, P.M., Saleska, S.R., Rich, V.I., Tyson, G.W., 2018. Genome-centric view of carbon processing in thawing permafrost. *Nature* 560, 49–54. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0338-1>
- Wüst, P.K., Horn, M.A., Drake, H.L., 2009. Trophic links between fermenters and methanogens in a moderately acidic fen soil. *Environ. Microbiol.* 11, 1395–1409. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01867.x>
- Xu, J., Morris, P.J., Liu, J., Holden, J., 2018. PEATMAP: Refining estimates of global peatland distribution based on a meta-analysis. *CATENA* 160, 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2017.09.010>
- Xue, Y., Jonassen, I., Øvreås, L., Taş, N., 2020. Metagenome-assembled genome distribution and key functionality highlight importance of aerobic metabolism in Svalbard permafrost. *FEMS Microbiol. Ecol.* 96, fiaa057. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa057>
- Ye, R., Jin, Q., Bohannan, B., Keller, J.K., McAllister, S.A., Bridgham, S.D., 2012. pH controls over anaerobic carbon mineralization, the efficiency of methane production, and methanogenic pathways in peatlands across an ombrotrophic–minerotrophic gradient. *Soil Biol. Biochem.* 54, 36–47. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.05.015>
- Yu, Z., Loisel, J., Brosseau, D.P., Beilman, D.W., Hunt, S.J., 2010. Global peatland dynamics since the Last Glacial Maximum: GLOBAL PEATLANDS SINCE THE LGM. *Geophys. Res. Lett.* 37, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1029/2010GL043584>
- Zhang, H., Yohe, T., Huang, L., Entwistle, S., Wu, P., Yang, Z., Busk, P.K., Xu, Y., Yin, Y., 2018. dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation 7.
- Zhang, S., Zhang, Z., Xia, S., Ding, N., Long, X., Wang, J., Chen, M., Ye, C., Chen, S., 2020. Combined genome-centric metagenomics and stable isotope probing unveils the microbial pathways of aerobic methane oxidation coupled to denitrification process under hypoxic conditions. *Bioresour. Technol.* 318, 124043. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124043>
- Zhu, X., Campanaro, S., Treu, L., Kougias, P.G., Angelidaki, I., 2019. Novel ecological insights and functional roles during anaerobic digestion of saccharides unveiled by genome-centric metagenomics. *Water Res.* 151, 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.041>



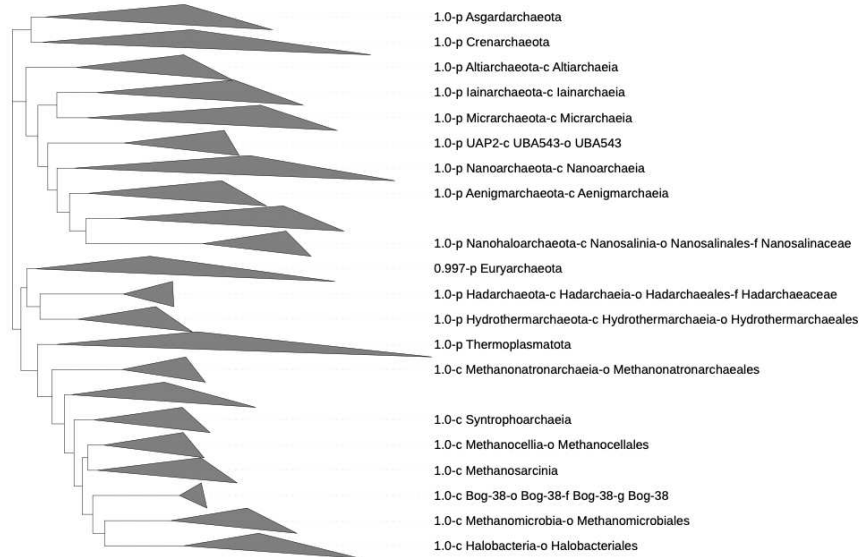
Supplementary data



Supplementary data Figure VI.6. a) MAGs diversity coverage (calculated from bowtie2 tools and mapping raw read of each metagenome against the 515 MAGs) in function of the specific richness (calculated from 16S rRNA genes recovered in the 24 metagenomes) b) 16S rRNA gene recovered in the Bog, Eutrophic and Oligotrophic Fen summed at phylum level c) sum of the genomes assembled in Bernadouze at phylum level.

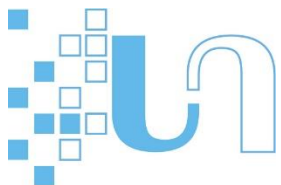


Tree scale: 1



Supplementary data Figure VI.7. Bog-38 and Methanomicrobiales location in the Archaeal phylogenomic tree.

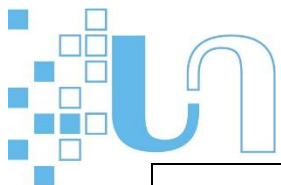
Phylogenetic tree of Archaea estimated through GTDB-tk. Tree was estimated based on the concatenated phylogeny of 122 archaeal single copy marker genes



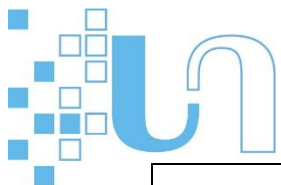
Supplementary data Table VI-1. Main features of the 290 Metagenome Assembled Genomes from Bernadouze.

The "Nb of MAGs" column represents the number of genomes which has been assembled among the 515 MAGs belonging to this clade.

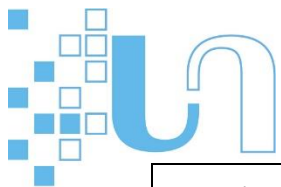
ID	Nb of MAGs	GC	Completeness	Contamination	Domain	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Cumulative recruitment
381_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.25.fasta	1	39.1	61.92	0.93	Archaea	Aenigmarchaeota	Aenigmarchaeia	Aenigmarchaeales	Aenigmarchaeaceae	Unclassified	Unclassified	6.5
123_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.21.fasta	1	51.2	63.24	4.21	Archaea	Asgardarchaeota	Lokiarchaeia	Thorarchaeales	Thorarchaeaceae	Unclassified	Unclassified	9.7
363_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.8.fasta	1	45.1	70.87	2.8	Archaea	Asgardarchaeota	Lokiarchaeia	CR-4	Unclassified	Unclassified	Unclassified	9.8
123_contigs_tot.fasta_bin.2.11.fasta	1	46.9	81.78	5.61	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	B26-1	UBA233	20-14-0-80-47-9	Unclassified	31.6
123_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.20.fasta	1	51.2	72.17	3.88	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	40CM-2-53-6	Unclassified	Unclassified	Unclassified	17.9
123_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.26.fasta	1	48.5	59.22	1.94	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	B26-1	UBA233	20-14-0-80-47-9	Unclassified	19.8



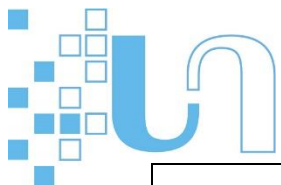
123_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.34.fa.fasta	1	54.7	91.75	3.88	Archaea	Crenarchaeota	Nitrososphaeria	EX4484-205	Unclassified	Unclassified	Unclassified	7.4
123_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.40.fa.fasta	2	44.8	97.2	4.67	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	B26-1	UBA233	UBA11855	Unclassified	19.1
141_contigs_tot.fasta_bin.1.6.fa.fasta	1	49.0	53.81	1.4	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	B26-1	UBA233	20-14-0-80-47-9	Unclassified	131.0
141_contigs_tot.fasta_bin.2.9.fa.fasta	1	46.4	81.78	5.61	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	B26-1	UBA233	20-14-0-80-47-9	Unclassified	108.5
141_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.26.fa.fasta	2	46.0	67.48	2.91	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	B26-1	UBA233	20-14-0-80-47-9	Unclassified	25.4
333_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.56.fa.fasta	1	47.7	76.4	4.37	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	B26-1	UBA233	UBA11855	Unclassified	26.3
333_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.64.fa.fasta	2	56.1	95.79	3.27	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	TCS64	TCS64	Unclassified	Unclassified	15.9
351_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.1.fa.fasta	2	50.7	72.65	0.97	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	40CM-2-53-6	Unclassified	Unclassified	Unclassified	261.8
351_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.14.fa.fasta	1	47.9	95.15	4.37	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	B26-1	UBA233	20-14-0-80-47-9	Unclassified	59.6
351_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.2.fa.fasta	1	46.0	85.21	2.8	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	B26-1	UBA233	Unclassified	Unclassified	10.9
361_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.43.fa.fasta	3	49.2	96.73	3.74	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	B26-1	UBA233	20-14-0-80-47-9	Unclassified	49.7



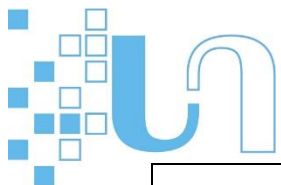
361_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.48.fa.fasta	1	47.6	51.16	1.87	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	B26-1	UBA233	20-14-0-80-47-9	Unclassified	58.9
362_contigs_tot.fasta_bin.1.4.fa.fasta	3	42.8	97.77	5.28	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	B26-1	UBA233	Unclassified	Unclassified	38.6
363_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.56.fa.fasta	2	58.1	63.14	0	Archaea	Crenarchaeota	Nitrososphaeria	UBA164	Unclassified	Unclassified	Unclassified	16.5
363_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.61.fa.fasta	2	56.8	95.06	2.91	Archaea	Crenarchaeota	Nitrososphaeria	Nitrososphaerales	UBA183	UBA183	Unclassified	53.8
363_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.63.fa.fasta	4	47.8	98.67	3.74	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	B26-1	UBA233	20-14-0-80-47-9	Unclassified	165.7
363_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.64.fa.fasta	3	50.3	96.6	5.83	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	40CM-2-53-6	FEN-987	FEN-987	Unclassified	25.0
381_contigs_tot.fasta_bin.3.17.fa.fasta	1	47.9	96.26	4.67	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	B26-1	UBA233	20-14-0-80-47-9	Unclassified	30.9
381_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.50.fa.fasta	1	48.0	70.24	2.8	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	B26-1	UBA233	20-14-0-80-47-9	Unclassified	19.8
423_contigs_tot.fasta_bin.3.9.fa_Seqs_Level.6.CR_Taxon-PALSA-986.fasta	2	42.7	64.49	4.35	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	B26-1	UBA233	PALSA-986	Unclassified	32.5
423_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.13.fa.fasta	1	47.1	97.2	4.05	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	B26-1	UBA233	20-14-0-80-47-9	Unclassified	17.4
423_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.19.fa.fasta	2	42.1	99.07	4.21	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	B26-1	UBA233	20-14-0-80-47-9	Unclassified	37.3



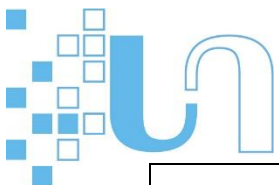
423_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.2.fa.fasta	2	47.7	74.69	0.93	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	B26-1	UBA233	20-14-0-80-47-9	Unclassified	79.6
423_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.31.fa.fasta	1	46.0	66.99	0	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	B26-1	UBA233	20-14-0-80-47-9	Unclassified	93.4
62_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.8.fa.fasta	2	56.7	96.28	0.97	Archaea	Crenarchaeota	Nitrososphaeria	Nitrososphaerales	UBA183	UBA183	Unclassified	130.2
63_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.28.fa.fasta	2	57.2	88.6	0.97	Archaea	Crenarchaeota	Nitrososphaeria	Nitrososphaerales	UBA183	UBA183	Unclassified	87.0
81_contigs_tot.fasta_bin.2.16.fa.fasta	4	57.3	61.33	0	Archaea	Crenarchaeota	Nitrososphaeria	Nitrososphaerales	UBA183	UBA183	Unclassified	215.6
81_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.10.fa.fasta	1	58.0	91.18	2.43	Archaea	Crenarchaeota	Nitrososphaeria	Nitrososphaerales	UBA183	UBA183	Unclassified	52.0
81_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.21.fa.fasta	1	52.7	59.19	2.18	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	40CM-2-53-6	Unclassified	Unclassified	Unclassified	51.7
81_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.46.fa.fasta	2	45.5	100	4.67	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	B26-1	UBA233	20-14-0-80-47-9	Unclassified	60.2
81_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.47.fa.fasta	6	56.5	94.09	2.43	Archaea	Crenarchaeota	Nitrososphaeria	Nitrososphaerales	UBA183	UBA183	Unclassified	293.6
Peatland-Pacbio-361_binning.fasta_bin.20.fa.fasta	6	45.9	99.07	2.8	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	B26-1	UBA233	20-14-0-80-47-9	Unclassified	82.4
Peatland-Pacbio-361_binning.fasta_bin.38.fa.fasta	2	50.4	97.57	1.94	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	40CM-2-53-6	Unclassified	Unclassified	Unclassified	29.9



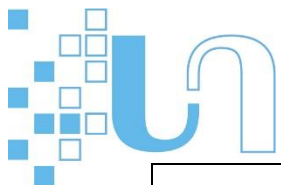
Peatland-Pacbio-361_binning.fasta_bin.45.fasta	5	43.8	100	2.8	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	B26-1	UBA233	20-14-0-80-47-9	Unclassified	58.7
Peatland-Pacbio-361_binning.fasta_bin.47.fasta	1	50.3	95.63	2.91	Archaea	Crenarchaeota	Bathyarchaeia	40CM-2-53-6	Unclassified	Unclassified	Unclassified	191.2
33_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.2.fasta	2	53.0	80.17	0	Archaea	Halobacterota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanoregulaceae	Unclassified	Unclassified	31.2
381_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.53.fasta	2	42.4	77.63	0	Archaea	Halobacterota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanoregulaceae	Unclassified	Unclassified	7.5
61_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.4.fasta	1	52.1	69.03	0.65	Archaea	Halobacterota	Bog-38	Bog-38	Bog-38	Bog-38	Unclassified	134.9
63_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.4.fasta	3	52.5	86.27	0.65	Archaea	Halobacterota	Bog-38	Bog-38	Bog-38	Bog-38	Unclassified	338.0
81_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.31.fasta	1	50.6	67.99	0	Archaea	Micrarchaeota	Micrarchaeia	Micrarchaeales	Unclassified	Unclassified	Unclassified	6.8
33_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.64.fasta	1	40.2	93.6	4	Archaea	Thermoplasmata	E2	DHVEG-1	DHVEG-1	SM1-50	Unclassified	11.9
423_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.1.fasta	2	56.2	98.4	1.6	Archaea	Thermoplasmata	Thermoplasmata	UBA10834	UBA10834	COMBO-56-21	Unclassified	9.5
61_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.52.fasta	4	67.8	97.2	1.6	Archaea	Thermoplasmata	Thermoplasmata	UBA184	UBA184	UBA184	Unclassified	42.7
62_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.35.fasta	6	67.4	95.07	2.4	Archaea	Thermoplasmata	Thermoplasmata	UBA184	UBA184	UBA184	Unclassified	73.0



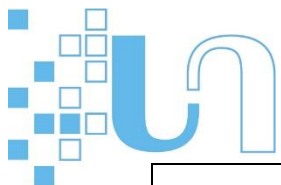
121_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.20.fa.fasta	2	63.0	94.29	3.7	Bacteria	Acidobacteriota	Aminicenantia	Aminicenantales	RBG-16-66-30	RBG-16-66-30	Unclassified	20.0
121_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.21.fa.fasta	1	58.3	52.73	0	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	UBA7541	UBA7541	UBA7541	Unclassified	12.2
121_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.7.fa.fasta	1	68.5	90.22	1.03	Bacteria	Acidobacteriota	Thermoanaerobaculia	UBA5066	UBA5066	Fen-183	Unclassified	17.9
123_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.8.fa.fasta	1	60.5	91.11	5.13	Bacteria	Acidobacteriota	Aminicenantia	Aminicenantales	UBA8522	Unclassified	Unclassified	15.6
123_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.9.fa.fasta	2	61.2	97.22	1.71	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	UBA7540	UBA7540	Unclassified	Unclassified	45.8
141_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.6.fa.fasta	1	65.5	74.32	5.02	Bacteria	Acidobacteriota	Aminicenantia	Aminicenantales	RBG-16-66-30	Unclassified	Unclassified	27.3
141_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.9.fa.fasta	1	66.8	63.67	1.71	Bacteria	Acidobacteriota	Vicinamibacterias	Vicinamibacterales	Fen-181	Fen-181	Unclassified	12.5
1Peatland-Pacbio-331_binning.fasta_bin.12.fa.fasta	2	70.5	90.6	1.76	Bacteria	Acidobacteriota	Thermoanaerobaculia	Thermoanaerobaculales	Thermoanaerobaculaceae	RBG-13-68-16	Unclassified	9.8
1Peatland-Pacbio-331_binning.fasta_bin.13.fa.fasta	2	60.1	95.65	0.92	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Bryobacteriales	Bryobacteraceae	Palsa-187	Unclassified	6.4
1Peatland-Pacbio-331_binning.fasta_bin.22.fa.fasta	2	59.3	96.31	2.56	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Acidobacteriales	Koribacteraceae	PALSA-270	Unclassified	8.5
1Peatland-Pacbio-331_binning.fasta_bin.36.fa.fasta	3	56.5	82.55	3.85	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Acidobacteriales	Koribacteraceae	PALSA-188	Unclassified	16.1



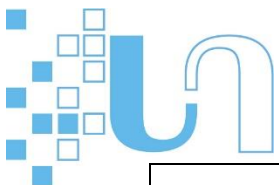
31_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.19.fa.fasta	1	69.6	97.86	1.71	Bacteria	Acidobacterio ta	Thermoanaerob aculia	UBA5066	UBA5066	Fen-183	Unclassif ied	7.3
31_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.26.fa.fasta	1	58.3	78.99	4.27	Bacteria	Acidobacterio ta	Acidobacteriae	UBA7541	UBA7541	UBA7541	Unclassif ied	11.2
31_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.31.fa.fasta	1	60.2	70.09	2.56	Bacteria	Acidobacterio ta	Acidobacteriae	Acidobacteriales	Koribacteraceae	Sulfotelmato bacter	Unclassif ied	8.2
31_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.33.fa.fasta	1	60.8	95.73	3.42	Bacteria	Acidobacterio ta	Acidobacteriae	UBA7541	UBA7541	Palsa-295	Unclassif ied	5.3
31_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.37.fa.fasta	1	64.5	89.26	4.39	Bacteria	Acidobacterio ta	Acidobacteriae	Bryobacterales	Bryobacteraceae	Unclassified	Unclassif ied	7.5
31_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.43.fa.fasta	3	58.9	95.71	0.85	Bacteria	Acidobacterio ta	Acidobacteriae	Acidobacteriales	Koribacteraceae	Bog-209	Unclassif ied	285.9
31_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.52.fa.fasta	2	58.9	74.7	1.71	Bacteria	Acidobacterio ta	Acidobacteriae	UBA7540	UBA7540	UBA7540	Unclassif ied	34.8
31_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.59.fa.fasta	1	58.2	95.31	0.91	Bacteria	Acidobacterio ta	Acidobacteriae	Acidobacteriales	Koribacteraceae	Bog-209	Unclassif ied	40.9
31_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.71.fa.fasta	1	58.6	80.29	4.27	Bacteria	Acidobacterio ta	Acidobacteriae	Acidobacteriales	Koribacteraceae	Bog-209	Unclassif ied	24.1
31_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.75.fa.fasta	1	58.5	65.75	2.35	Bacteria	Acidobacterio ta	Acidobacteriae	Acidobacteriales	Koribacteraceae	Bog-257	Unclassif ied	22.4
31_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.9.fa.fasta	1	58.0	61.81	2.56	Bacteria	Acidobacterio ta	Acidobacteriae	Acidobacteriales	Koribacteraceae	Sulfotelmato bacter	Unclassif ied	18.1



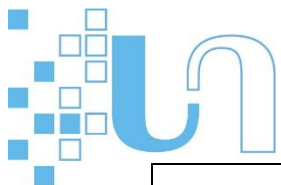
31_contigs_tot1.fasta_bin.1.22.fasta	1	58.2	55.29	4.32	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Acidobacteriales	Koribacteraceae	40CM-3-55-5	Unclassified	12.5
32_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.32.fasta	3	64.1	86.67	0	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Bryobacterales	Bryobacteraceae	Unclassified	Unclassified	32.3
33_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.16.fasta	2	54.8	85.13	5.98	Bacteria	Acidobacteriota	Aminicenantia	Aminicenantales	UBA4085	Unclassified	Unclassified	20.9
33_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.23.fasta	1	56.2	54.15	5.75	Bacteria	Acidobacteriota	Aminicenantia	Aminicenantales	UBA4085	Unclassified	Unclassified	7.4
331_contigs_tot.fasta_bin.1.2.fasta	2	60.8	92.38	2.05	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	UBA7541	UBA7541	Unclassified	Unclassified	8.9
331_contigs_tot.fasta_bin.1.7.fasta	2	58.5	83.18	2.56	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Acidobacteriales	Koribacteraceae	Bog-209	Unclassified	30.3
331_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.10.fasta	2	58.0	96.77	1.72	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Terracidiphilus	Unclassified	11.5
331_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.12.fasta	2	58.1	94.6	0.85	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Acidobacteriales	Koribacteraceae	Bog-209	Unclassified	55.2
331_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.30.fasta	3	57.7	93.59	5.98	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Acidobacteriales	Koribacteraceae	Bog-257	Unclassified	12.7
331_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.33.fasta	1	59.9	58.62	2.59	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Bryobacterales	Bryobacteraceae	QHxW01	Unclassified	8.4
331_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.7.fasta	3	62.6	95.58	0	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Acidobacteriales	QIAW01	Unclassified	Unclassified	18.4



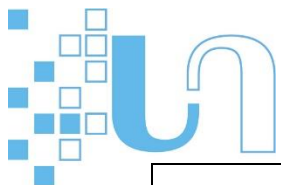
332_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.33.fasta	1	61.2	95.16	4.27	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	UBA7541	UBA7541	Unclassified	Unclassified	8.5
332_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.52.fasta	1	58.7	86.27	2.14	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Acidobacteriales	Koribacteraceae	Bog-209	Unclassified	32.4
333_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.11.fasta	5	63.9	93.68	3.85	Bacteria	Acidobacteriota	Aminicenantia	Aminicenantales	RBG-16-66-30	RBG-16-66-30	Unclassified	41.9
333_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.28.fasta	2	61.4	91.24	0.9	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	UBA7540	UBA7540	Unclassified	Unclassified	18.4
333_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.30.fasta	1	67.4	81.53	3.42	Bacteria	Acidobacteriota	Vicinamibacteria	Vicinamibacterales	Fen-181	Fen-181	Unclassified	10.1
333_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.57.fasta	2	58.2	66.5	1.71	Bacteria	Acidobacteriota	Aminicenantia	Aminicenantales	UBA8522	UBA8522	Unclassified	81.1
351_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.26.fasta	1	64.7	89.91	0.93	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Bryobacterales	Bryobacteraceae	Fen-330	Unclassified	38.4
351_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.29.fasta	4	63.1	98.26	3.48	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Bryobacterales	Bryobacteraceae	Unclassified	Unclassified	28.0
361_contigs_tot.fasta_bin.3.8.fasta	2	59.1	67.24	3.45	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Acidobacteriales	Koribacteraceae	Bog-209	Unclassified	69.5
361_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.36.fasta	1	58.8	54.68	4.27	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	UBA7541	UBA7541	UBA7541	Unclassified	34.1
362_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.4.fasta	1	58.2	89.14	3.42	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Acidobacteriales	Koribacteraceae	Bog-209	Unclassified	43.8



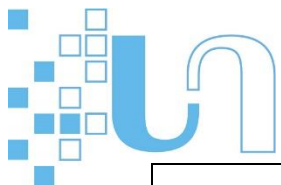
363_contigs_tot.fasta_bin.3.5.fasta	1	60.0	61.56	4.27	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	UBA7540	UBA7540	Unclassified	Unclassified	27.3
363_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.26.fasta	3	59.3	96.53	0.85	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Acidobacteriales	Koribacteraceae	Sulfotelmatobacter	Unclassified	37.0
363_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.45.fasta	1	63.3	58.55	0.33	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Bryobacterales	Bryobacteraceae	Unclassified	Unclassified	16.1
363_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.46.fasta	1	62.2	84.66	0.88	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Bryobacterales	Bryobacteraceae	Unclassified	Unclassified	33.3
363_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.49.fasta	1	63.4	78.07	2.63	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Bryobacterales	Bryobacteraceae	Bog-375	Unclassified	13.2
381_contigs_tot.fasta_bin.3.1.fasta_Seqs_Level.6.CR_Taxon-Bog-209.fasta	1	58.9	66	5.13	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Acidobacteriales	Koribacteraceae	Bog-209	Unclassified	56.0
381_contigs_tot.fasta_bin.3.11.fasta_Seqs_Level.5.CR_Taxon-UBA7540.fasta	1	58.7	76.04	1.71	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	UBA7540	UBA7540	Unclassified	Unclassified	33.4
381_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.32.fasta	1	63.4	53.79	1.76	Bacteria	Acidobacteriota	Aminicenantia	Aminicenantales	RBG-16-66-30	Unclassified	Unclassified	17.7
421_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.11.fasta	1	62.8	99.15	0	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Acidobacteriales	QIAW01	Unclassified	Unclassified	23.9
421_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.9.fasta	1	58.0	70.98	4.27	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Acidobacteriales	Koribacteraceae	Sulfotelmatobacter	Unclassified	30.4
422_contigs_tot.fasta_bin.1.2.fasta	1	64.7	50.09	0.43	Bacteria	Acidobacteriota	Aminicenantia	Aminicenantales	RBG-16-66-30	Unclassified	Unclassified	99.3



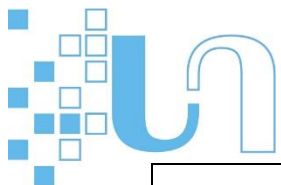
422_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.5.fa.fasta	2	60.4	83.87	0.05	Bacteria	Acidobacterio ta	Acidobacteriae	UBA7540	UBA7540	Unclassified	Unclassif ied	26.6
423_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.16.fa.fast a	2	64.5	85.13	2.14	Bacteria	Acidobacterio ta	Aminicenantia	Aminicenantales	RBG-16-66-30	Unclassified	Unclassif ied	97.2
423_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.17.fa.fast a	1	54.6	83.11	3.85	Bacteria	Acidobacterio ta	Aminicenantia	Aminicenantales	UBA4085	Unclassified	Unclassif ied	18.7
423_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.36.fa.fast a	2	60.3	84.44	4.27	Bacteria	Acidobacterio ta	Aminicenantia	Aminicenantales	UBA4085	Unclassified	Unclassif ied	15.0
441_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.4.fa.fasta	2	62.7	83.13	3.42	Bacteria	Acidobacterio ta	Aminicenantia	Aminicenantales	RBG-16-66-30	Unclassified	Unclassif ied	31.9
51_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.4.fa.fasta	1	64.0	83.33	4.91	Bacteria	Acidobacterio ta	Aminicenantia	Aminicenantales	RBG-16-66-30	Unclassified	Unclassif ied	13.7
61_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.17.fa.fasta	5	58.9	95.46	5.13	Bacteria	Acidobacterio ta	Acidobacteriae	UBA7540	UBA7540	Bog-366	Unclassif ied	48.1
61_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.18.fa.fasta	3	62.6	97.37	2.92	Bacteria	Acidobacterio ta	Acidobacteriae	Bryobacterales	Bryobacteraceae	PALSA-129	Unclassif ied	41.6
61_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.45.fa.fasta	3	68.5	96.15	0.85	Bacteria	Acidobacterio ta	Thermoanaerob aculia	UBA5066	UBA5066	Fen-183	Unclassif ied	28.7
61_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.49.fa.fasta	1	62.7	88.46	2.63	Bacteria	Acidobacterio ta	Acidobacteriae	Bryobacterales	Bryobacteraceae	Unclassified	Unclassif ied	11.1
61_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.53.fa.fasta	1	55.1	73.22	1.71	Bacteria	Acidobacterio ta	Acidobacteriae	Unclassified	Unclassified	Unclassified	Unclassif ied	7.7



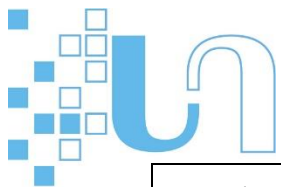
61_contigs_tot1.fasta_bin.1.17.fasta	3	59.0	91.61	4.89	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	UBA7540	UBA7540	Unclassified	Unclassified	24.4
62_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.15.fasta	2	58.2	92.44	3.47	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	UBA7541	UBA7541	UBA7541	Unclassified	70.0
62_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.19.fasta	3	61.2	91.19	1.24	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Terracidiphilus	Unclassified	37.0
62_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.25.fasta	1	57.4	71.58	0.85	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	UBA7541	UBA7541	Unclassified	Unclassified	8.0
62_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.31.fasta	2	63.0	93.27	0.88	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Bryobacterales	Bryobacteraceae	Fen-178	Unclassified	56.2
63_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.20.fasta	2	62.4	73.44	0.44	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Bryobacterales	Bryobacteraceae	Bog-159	Unclassified	21.8
63_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.37.fasta	1	57.9	62.39	0.85	Bacteria	Acidobacteriota	UBA6911	UBA6911	UBA6911	Unclassified	Unclassified	37.7
63_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.9.fasta	1	58.2	74.15	2.14	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	UBA7541	UBA7541	UBA7541	Unclassified	56.4
81_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.28.fasta	2	64.8	100	1.75	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Bryobacterales	Bryobacteraceae	Unclassified	Unclassified	39.5
81_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.44.fasta	1	66.5	76.15	3.85	Bacteria	Acidobacteriota	Thermoanaerobaculia	Thermoanaerobaculales	Thermoanaerobaculaceae	Unclassified	Unclassified	9.8
81_contigs_tot1.fasta_bin.1.9.fasta	2	58.1	95.73	0.85	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	UBA7541	UBA7541	Unclassified	Unclassified	22.5



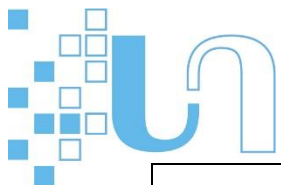
bins_Peatland-Pacbio-331_to_clean.fasta_bin.3.fasta	2	59.4	89.53	5.43	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Acidobacteriales	Koribacteraceae	Sulfotelmato bacter	Unclassified	12.9
Peatland-Pacbio-361_binning.fasta_bin.39.fasta	2	61.0	90.65	2.56	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	UBA7541	UBA7541	Palsa-295	Unclassified	11.2
Peatland-Pacbio-361_binning.fasta_bin.61.fasta	2	58.2	81.84	3.04	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Acidobacteriales	Koribacteraceae	Unclassified	Unclassified	14.5
361_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.39.fasta	3	68.0	96.58	1.28	Bacteria	Actinobacteriota	Acidimicrobia	Acidimicrobiales	Bog-793	Bog-793	Unclassified	15.6
61_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.28.fasta	1	69.7	52.24	2.59	Bacteria	Actinobacteriota	Actinobacteria	Streptosporangiales	Streptosporangiales	Palsa-504	Unclassified	10.7
62_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.9.fasta	1	69.5	96.39	2.99	Bacteria	Actinobacteriota	Acidimicrobia	Acidimicrobiales	Bog-793	Bog-793	Unclassified	11.7
Peatland-Pacbio-361_binning.fasta_bin.29.fasta	2	69.7	97.06	3.43	Bacteria	Actinobacteriota	Actinobacteria	Streptosporangiales	Streptosporangiales	Palsa-504	Unclassified	19.5
33_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.24.fasta	2	67.7	82.41	2.78	Bacteria	Armatimonadota	Unclassified	Unclassified	Unclassified	Unclassified	Unclassified	18.3
121_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.2.fasta	1	40.9	96.56	2.15	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	vadinHA17	Unclassified	Unclassified	14.0
121_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.4.fasta	1	51.8	59.29	0.82	Bacteria	Bacteroidota	UBA10030	UBA10030	UBA8401	Unclassified	Unclassified	7.8
141_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.17.fasta	1	41.2	98.1	2.41	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	vadinHA17	Unclassified	Unclassified	27.1



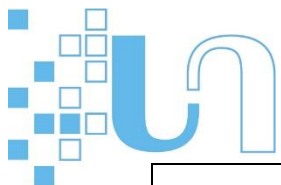
1Peatland-Pacbio-331_binning.fasta_bin.25.fasta	3	48.3	98.21	3.01	Bacteria	Bacteroidota	Kryptonia	Unclassified	Unclassified	Unclassified	Unclassified	18.0
31_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.1.fasta	2	45.9	97.13	4.37	Bacteria	Bacteroidota	Kryptonia	Unclassified	Unclassified	Unclassified	Unclassified	11.4
31_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.39.fasta	2	50.0	98.34	2.73	Bacteria	Bacteroidota	Kryptonia	Unclassified	Unclassified	Unclassified	Unclassified	13.4
31_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.57.fasta	1	43.8	95.24	2.54	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	vadinHA17	LD21	Unclassified	5.5
32_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.10.fasta	2	35.4	98.88	1.12	Bacteria	Bacteroidota	Ignavibacteria	Ignavibacteriales	Ignavibacteriaceae	Unclassified	Unclassified	18.8
332_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.40.fasta	1	52.3	95.63	3.11	Bacteria	Bacteroidota	UBA10030	UBA10030	UBA6906	UBA11986	Unclassified	7.5
333_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.38.fasta	2	39.9	99.05	1.75	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	vadinHA17	LD21	Unclassified	9.3
351_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.25.fasta	3	39.7	99.05	2.54	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	vadinHA17	LD21	Unclassified	21.2
351_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.27.fasta	1	39.4	98.57	1.59	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	SM23-62	SM23-62	Unclassified	6.5
361_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.44.fasta	4	46.8	98.34	4.1	Bacteria	Bacteroidota	Kryptonia	Unclassified	Unclassified	Unclassified	Unclassified	93.3
362_contigs_tot.fasta_bin.1.17.fasta	1	47.8	53.95	0.55	Bacteria	Bacteroidota	Kryptonia	Unclassified	Unclassified	Unclassified	Unclassified	35.5



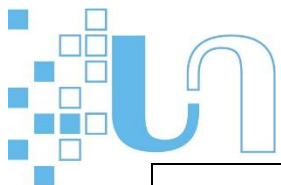
441_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.27.fa.fasta	1	40.9	99.05	2.06	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	vadinHA17	Unclassified	Unclassified	26.0
51_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.14.fa.fasta	1	39.7	98.1	2.54	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	vadinHA17	LD21	Unclassified	21.2
31_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.29.fa.fasta	1	68.5	68.14	1.29	Bacteria	Binatota	Binatia	HRBIN30	Unclassified	Unclassified	Unclassified	5.8
31_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.63.fa.fasta	1	59.6	95.8	3.36	Bacteria	Binatota	Binatia	Binatales	Binataceae	Unclassified	Unclassified	5.1
381_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.2.fa.fasta	1	63.2	78.24	4.52	Bacteria	Binatota	Binatia	HRBIN30	Unclassified	Unclassified	Unclassified	15.7
61_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.22.fa.fasta	1	62.0	55.94	1.71	Bacteria	Binatota	Binatia	Binatales	Binataceae	Binatus	Unclassified	14.2
Peatland-Pacbio-361_binning.fasta_Seqs_Level.4.CR_Taxon-HRBIN30.fasta	3	63.9	59.71	1.29	Bacteria	Binatota	Binatia	HRBIN30	Unclassified	Unclassified	Unclassified	25.6
121_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.14.fa.fasta	1	55.1	81.82	3.39	Bacteria	Chloroflexota	Anaerolineae	Anaerolineales	UBA6092	Unclassified	Unclassified	10.5
123_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.15.fa.fasta	2	47.9	92.24	2.09	Bacteria	Chloroflexota	Dehalococcoidia	GIF9	AB-539-J10	RBG-13-51-36	Unclassified	39.3
31_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.51.fa.fasta	1	50.9	73.22	1.09	Bacteria	Chloroflexota	Anaerolineae	Anaerolineales	envOPS12	Fen-1038	Unclassified	3.4



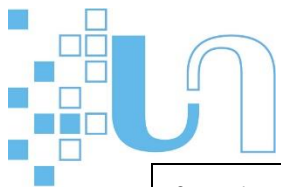
32_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.12.fa.fasta	1	72.0	71.11	1.49	Bacteria	Chloroflexota	Ellin6529	CSP1-4	CSP1-4	Unclassified	Unclassified	7.9
32_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.21.fa.fasta	1	48.4	53.79	0.99	Bacteria	Chloroflexota	Dehalococcidia	GIF9	UBA5620	9FT-COMBO-48-23	Unclassified	61.8
32_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.44.fa.fasta	4	51.6	87.27	1.82	Bacteria	Chloroflexota	Anaerolineae	Anaerolineales	envOPS12	UBA877	Unclassified	33.6
32_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.55.fa.fasta	3	63.9	88.64	3.64	Bacteria	Chloroflexota	Anaerolineae	Anaerolineales	Unclassified	Unclassified	Unclassified	20.0
33_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.10.fa.fasta	2	49.2	84.93	1.98	Bacteria	Chloroflexota	Dehalococcidia	Dehalococcoidales	UBA5760	Unclassified	Unclassified	18.3
33_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.13.fa.fasta	1	48.3	71.94	0	Bacteria	Chloroflexota	Dehalococcidia	GIF9	UBA5620	9FT-COMBO-48-23	Unclassified	10.5
33_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.17.fa.fasta	2	48.1	63.56	0.99	Bacteria	Chloroflexota	Dehalococcidia	GIF9	UBA5620	9FT-COMBO-48-23	Unclassified	60.7
33_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.25.fa.fasta	1	51.2	85.45	2.73	Bacteria	Chloroflexota	Anaerolineae	Anaerolineales	UBA6092	Unclassified	Unclassified	4.8
33_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.39.fa.fasta	1	66.2	92.74	3.36	Bacteria	Chloroflexota	Dehalococcidia	SM23-28-2	Unclassified	Unclassified	Unclassified	17.7
33_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.42.fa.fasta	1	50.4	62.73	1.82	Bacteria	Chloroflexota	Anaerolineae	Anaerolineales	UBA6092	FEB-25	Unclassified	8.6
33_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.44.fa.fasta	1	48.0	62.98	0	Bacteria	Chloroflexota	Dehalococcidia	GIF9	AB-539-J10	RBG-13-51-36	Unclassified	36.3



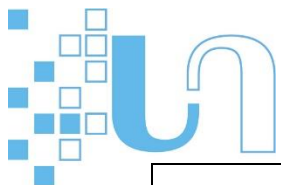
33_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.5.fa.fasta	2	51.4	96.7	1.49	Bacteria	Chloroflexota	Dehalococcidia	Dehalococcoidales	RBG-16-60-22	Unclassified	Unclassified	16.2
33_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.55.fa.fasta	2	53.4	91.75	0.99	Bacteria	Chloroflexota	Dehalococcidia	Dehalococcoidales	UBA2162	Unclassified	Unclassified	33.2
33_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.60.fa.fasta	1	61.1	68.91	1.38	Bacteria	Chloroflexota	Anaerolineae	UBA2200	UBA2200	Unclassified	Unclassified	3.1
332_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.1.fa.fasta	1	66.4	72.51	1.98	Bacteria	Chloroflexota	Dehalococcidia	SM23-28-2	RBG-16-68-14	RBG-16-68-14	Unclassified	4.6
332_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.2.fa.fasta	1	52.9	70	1.92	Bacteria	Chloroflexota	Anaerolineae	Anaerolineales	envOPS12	Fen-1038	Unclassified	5.1
333_contigs_tot.fasta_bin.3.19.fa_Seqs_Level.7.CR_Taxon-Palsat1033_sp003152165.fasta	1	73.6	51.03	6.9	Bacteria	Chloroflexota	Ellin6529	CSP1-4	CSP1-4	Unclassified	Unclassified	11.1
333_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.1.fa.fasta	3	48.0	93.86	0.99	Bacteria	Chloroflexota	Dehalococcidia	GIF9	UBA5620	9FT-COMBO-48-23	Unclassified	28.2
333_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.14.fa.fasta	2	49.8	93.04	1.98	Bacteria	Chloroflexota	Dehalococcidia	GIF9	AB-539-J10	RBG-13-51-36	Unclassified	47.7
333_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.36.fa.fasta	2	66.2	70.99	1.82	Bacteria	Chloroflexota	Anaerolineae	Anaerolineales	Unclassified	Unclassified	Unclassified	19.1
333_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.4.fa.fasta	2	49.1	91.75	2.09	Bacteria	Chloroflexota	Dehalococcidia	Dehalococcoidales	RBG-16-60-22	RBG-13-51-18	Unclassified	9.7



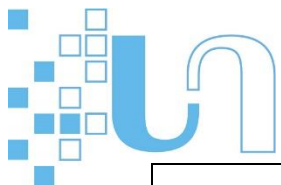
333_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.40.fa.fasta	1	48.6	59.57	0.11	Bacteria	Chloroflexota	Dehalococcidia	GIF9	AB-539-J10	RBG-13-51-36	Unclassified	17.2
333_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.42.fa.fasta	2	56.3	65.76	1.82	Bacteria	Chloroflexota	Anaerolineae	Anaerolineales	UBA6092	FEB-25	Unclassified	7.0
333_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.47.fa.fasta	2	50.9	67.58	1.82	Bacteria	Chloroflexota	Anaerolineae	Anaerolineales	envOPS12	Unclassified	Unclassified	17.2
333_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.48.fa.fasta	2	53.9	90.92	1.98	Bacteria	Chloroflexota	Dehalococcidia	Dehalococcoidales	UBA5760	Unclassified	Unclassified	158.5
333_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.49.fa.fasta	2	55.5	60.29	0	Bacteria	Chloroflexota	Dehalococcidia	Dehalococcoidales	Unclassified	Unclassified	Unclassified	18.1
333_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.59.fa.fasta	1	51.0	83.72	0.99	Bacteria	Chloroflexota	Dehalococcidia	SZUA-161	SZUA-161	Unclassified	Unclassified	12.9
333_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.8.fa.fasta	2	64.4	67.49	1.08	Bacteria	Chloroflexota	Dehalococcidia	SM23-28-2	SM23-28-2	SM23-28-2	Unclassified	7.9
351_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.35.fa.fasta	2	50.5	85.81	0.99	Bacteria	Chloroflexota	Dehalococcidia	SZUA-161	SZUA-161	Unclassified	Unclassified	15.7
351_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.37.fa.fasta	1	47.8	78.45	3.96	Bacteria	Chloroflexota	Dehalococcidia	GIF9	UBA5620	9FT-COMBO-48-23	Unclassified	24.9
363_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.10.fa.fasta	1	67.5	65.28	0	Bacteria	Chloroflexota	Ellin6529	CSP1-4	CSP1-4	Fen-1039	Unclassified	17.5
363_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.55.fa.fasta	1	52.2	96.7	0.99	Bacteria	Chloroflexota	Dehalococcidia	SZUA-161	SZUA-161	Unclassified	Unclassified	18.1



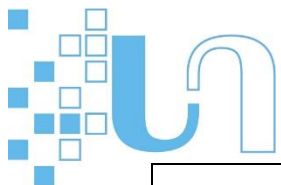
381_contigs_tot.fasta_bin.3.9.fa_Seqs_Level.7.CR_Taxon-Fen-1039_sp003141955.fasta	1	69.1	50.46	3.7	Bacteria	Chloroflexota	Ellin6529	CSP1-4	CSP1-4	Fen-1039	Unclassified	16.8
381_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.59.fa.fasta	2	57.6	90.3	2	Bacteria	Chloroflexota	Anaerolineae	Anaerolineales	envOPS12	UBA877	Unclassified	17.2
422_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.14.fa.fasta	1	68.2	84.72	2.96	Bacteria	Chloroflexota	Ellin6529	CSP1-4	CSP1-4	Fen-1039	Unclassified	16.3
423_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.35.fa.fasta	1	54.2	73.36	0	Bacteria	Chloroflexota	Dehalococcoidia	Dehalococcoidales	UBA2162	Unclassified	Unclassified	28.1
51_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.13.fa.fasta	1	50.5	50.78	0	Bacteria	Chloroflexota	Anaerolineae	Anaerolineales	UBA6092	FEB-25	Unclassified	6.9
51_contigs_tot1.fasta_bin.1.5.fa.fasta	3	54.0	93.73	3.96	Bacteria	Chloroflexota	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	UBA11361	Unclassified	24.7
61_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.23.fa.fasta	3	68.6	94.91	0.93	Bacteria	Chloroflexota	Ellin6529	CSP1-4	CSP1-4	Fen-1039	Unclassified	19.0
63_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.8.fa.fasta	2	52.6	80.42	3.96	Bacteria	Chloroflexota	Dehalococcoidia	UBA2777	RBG-13-53-26	Unclassified	Unclassified	16.7
81_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.37.fa.fasta	1	62.8	62.73	3.64	Bacteria	Chloroflexota	Anaerolineae	Anaerolineales	RBG-16-64-43	RBG-16-64-43	Unclassified	7.2
31_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.88.fa.fasta	3	58.5	95.16	0	Bacteria	Desulfobacterota	Desulfobaccia	Desulfobactales	0-14-0-80-60-11	0-14-0-80-60-11	Unclassified	25.7



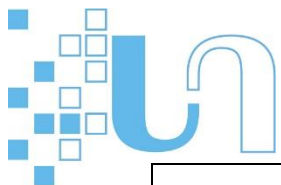
32_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.29.fa.fasta	3	59.6	81.99	2.15	Bacteria	Desulfobacterota	Desulfobaccia	Desulfobaccales	0-14-0-80-60-11	0-14-0-80-60-11	Unclassified	102.3
332_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.36.fa.fasta	3	53.0	75.85	3.87	Bacteria	Desulfobacterota	Desulfobacteria	Desulfatiglandales	HGW-15	Unclassified	Unclassified	54.8
332_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.45.fa.fasta	2	58.2	96.77	0	Bacteria	Desulfobacterota	Desulfobaccia	Desulfobaccales	0-14-0-80-60-11	Unclassified	Unclassified	32.2
332_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.46.fa.fasta	2	45.5	62.91	0.9	Bacteria	Desulfobacterota	BSNo33	BSNo33	UBA1163	UBA1163	Unclassified	59.0
333_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.35.fa.fasta	2	47.4	65.51	1.94	Bacteria	Desulfobacterota	BSNo33	BSNo33	UBA1163	Unclassified	Unclassified	21.8
361_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.42.fa.fasta	2	53.1	60.44	3.89	Bacteria	Desulfobacterota	BSNo33	SM23-61	SM23-61	Unclassified	Unclassified	26.1
363_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.53.fa.fasta	1	51.1	66.38	0	Bacteria	Desulfobacterota	Desulfomonilia	UBA1062	UBA1062	Unclassified	Unclassified	13.3
381_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.18.fa.fasta	2	49.0	79.03	2.93	Bacteria	Desulfobacterota	BSNo33	BSNo33	UBA1163	UBA1163	UBA1163 sp00231 1635	39.7
423_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.22.fa.fasta	1	46.8	51.09	4.22	Bacteria	Desulfobacterota	BSNo33	BSNo33	UBA1163	UBA1163	Unclassified	31.5
51_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.44.fa.fasta	1	53.5	90.32	3.55	Bacteria	Desulfobacterota	BSNo33	BSNo33	RBG-16-54-18	RBG-16-54-11	Unclassified	140.9



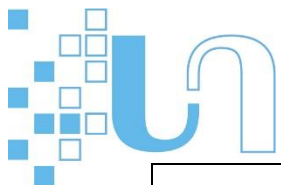
81_contigs_tot.fasta_bin.2.6.fasta	2	45.2	58.36	3.43	Bacteria	Desulfobacterota	BSNo33	BSNo33	UBA1163	UBA1163	Unclassified	47.3
bins_Peatland-Pacbio-361_to_clean.fasta_bin.4.fasta	2	48.3	93.55	4.73	Bacteria	Desulfobacterota	Syntrophia	Syntrophales	UBA2185	Fen-1135	Unclassified	19.1
Peatland-Pacbio-361_binning.fasta_bin.19.fasta	4	59.1	93.87	0.81	Bacteria	Desulfobacterota	Desulfobaccia	Desulfobaccales	o-14-0-80-60-11	o-14-0-80-60-11	Unclassified	54.8
Peatland-Pacbio-361_binning.fasta_bin.30.fasta	5	47.8	93.55	2.9	Bacteria	Desulfobacterota	BSNo33	BSNo33	UBA1163	UBA1163	Unclassified	124.9
363_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.18.fasta	2	54.2	93.76	1.94	Bacteria	Desulfuromonadota	Desulfuromonadia	Geobacterales	Geobacteraceae	Unclassified	Unclassified	34.1
381_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.20.fasta	1	54.7	73.36	2.47	Bacteria	Desulfuromonadota	Desulfuromonadia	Geobacterales	Geobacteraceae	Unclassified	Unclassified	14.9
62_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.29.fasta	1	56.9	62.45	0	Bacteria	Fibrobacterota	Chitinivibrionia	Chitinivibrionales	FEN-1185	FEN-1185	Unclassified	15.9
363_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.20.fasta	3	70.7	94.51	0	Bacteria	Gemmatimonadota	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	GWC2-71-9	Fen-1245	Unclassified	34.6
123_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.24.fasta	1	62.7	93.41	1.1	Bacteria	Krumholzibacteriota	Krumholzibacteriia	SSS58A	SSS58A	Unclassified	Unclassified	9.3
32_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.42.fasta	2	65.1	75.82	1.26	Bacteria	MBNT15	MBNT15	MBNT15	MBNT15	CG2-30-66-27	Unclassified	32.1
51_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.29.fasta	3	70.7	87.71	5.98	Bacteria	Methylomirabilota	Methylomirabilia	Rokubacteriales	GWA2-73-35	AR37	Unclassified	24.8



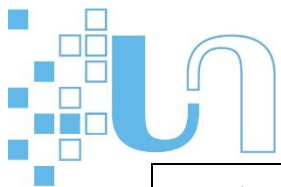
121_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.17.fa.fasta	1	51.4	62.15	2.91	Bacteria	Nitrospirota	Thermodesulfobri brionia	Thermodesulfobiv rionales	UBA68g8	Sulfobium	Unclassif ied	10.9
31_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.79.fa.fasta	1	53.4	96.82	4.55	Bacteria	Nitrospirota	UBA9217	UBA9217	UBA9217	Unclassified	Unclassif ied	12.1
32_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.46.fa.fasta	1	49.7	68.12	2.91	Bacteria	Nitrospirota	Thermodesulfovi brionia	Thermodesulfobiv rionales	UBA68g8	Sulfobium	Unclassif ied	12.3
32_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.50.fa.fasta	2	72.0	97.73	1.82	Bacteria	Nitrospirota	Nitrospira	2-01-FULL-66-17	Unclassified	Unclassified	Unclassif ied	21.4
32_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.52.fa.fasta	1	55.5	97.27	2.73	Bacteria	Nitrospirota	UBA9217	UBA9217	UBA9217	Unclassified	Unclassif ied	15.8
331_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.5.fa.fasta	3	50.3	95.45	4.07	Bacteria	Nitrospirota	Thermodesulfovi brionia	Thermodesulfobiv rionales	UBA68g8	Sulfobium	Unclassif ied	9.7
332_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.43.fa.fasta	2	53.2	77.27	5.73	Bacteria	Nitrospirota	UBA9217	UBA9217	UBA9217	Unclassified	Unclassif ied	32.9
332_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.47.fa.fasta	1	56.2	97.67	3.64	Bacteria	Nitrospirota	Nitrospira	2-01-FULL-66-17	Unclassified	Unclassified	Unclassif ied	19.6
351_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.41.fa.fasta	3	40.6	96.08	2.91	Bacteria	Nitrospirota	Thermodesulfovi brionia	Thermodesulfobiv rionales	SM23-35	Unclassified	Unclassif ied	33.6
422_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.3.fa.fasta	2	41.1	74.12	0.91	Bacteria	Nitrospirota	Thermodesulfovi brionia	Thermodesulfobiv rionales	SM23-35	Unclassified	Unclassif ied	48.0
423_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.9.fa.fasta	2	41.6	94.94	4.18	Bacteria	Nitrospirota	Thermodesulfovi brionia	Thermodesulfobiv rionales	SM23-35	Unclassified	Unclassif ied	21.0



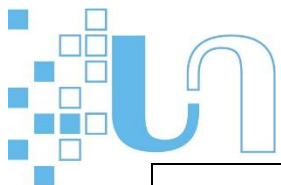
61_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.39.fa.fasta	2	51.3	53.28	0.18	Bacteria	Nitrospirota	Thermodesulfobri nionia	Thermodesulfobiv rionales	UBA6898	Sulfobium	Unclassif ied	11.7
32_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.15.fa.fasta	1	39.7	65.15	0	Bacteria	Patescibacteri a	Paceibacteria	UBA6257	UBA9933	UM-FILTER- 39-64	Unclassif ied	7.8
122_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.3.fa.fasta	1	49.1	59.85	2.38	Bacteria	Planctomycet ota	Phycisphaerae	SG8-4	SG8-4	RBG-13-46-10	Unclassif ied	9.9
123_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.7.fa.fasta	1	47.5	56.14	2.84	Bacteria	Planctomycet ota	Phycisphaerae	SG8-4	SG8-4	Unclassified	Unclassif ied	20.1
33_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.9.fa.fasta	1	48.1	93.18	1.24	Bacteria	Planctomycet ota	Phycisphaerae	SG8-4	SG8-4	RBG-13-46-10	Unclassif ied	15.0
33_contigs_tot1.fasta_bin.1.17.fa.fasta	1	46.8	75.82	3.98	Bacteria	Planctomycet ota	Phycisphaerae	SG8-4	SG8-4	RBG-13-46-10	Unclassif ied	19.2
333_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.44.fa.fast a	1	67.7	97.73	2.27	Bacteria	Planctomycet ota	FEN-1346	FEN-1346	FEN-1346	FEN-1346	Unclassif ied	14.6
381_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.21.fa.fast a	2	46.9	94.25	0	Bacteria	Planctomycet ota	Phycisphaerae	SG8-4	SG8-4	Unclassified	Unclassif ied	20.3
63_contigs_tot1.fasta_bin.1.16.fa.fasta	2	49.1	97.73	2.84	Bacteria	Planctomycet ota	Phycisphaerae	SG8-4	SG8-4	Fen-1362	Unclassif ied	23.5
121_contigs_tot.fasta_bin.2.7.fa.fasta	1	66.8	81.67	4.32	Bacteria	Proteobacteri a	Alphaproteobact eria	Rhodospirillales_A	2-12-FULL-67-15	Unclassified	Unclassif ied	7.8
123_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.4.fa.fasta	5	64.6	95.22	1.52	Bacteria	Proteobacteri a	Alphaproteobact eria	UBA11136	UBA11136	Unclassified	Unclassif ied	28.2



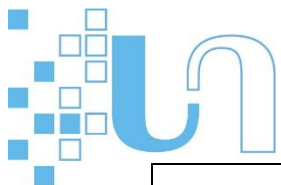
1Peatland-Pacbio-331_binning.fasta_bin.23.fasta	4	67.9	99.43	1.39	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	UKL13-2	GR16-43	Unclassified	22.5
1Peatland-Pacbio-331_binning.fasta_bin.41.fasta	1	66.2	56.9	0	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Dongiales	Dongiaceae	Unclassified	Unclassified	15.9
31_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.18.fasta	1	60.0	66.55	0	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Hydrogenophilaceae	Unclassified	Unclassified	4.8
31_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.6.fasta	2	57.7	90.85	2.44	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Acidiferrobacteriales	Sulfurifustaceae	Sulfuricaulis	Unclassified	11.0
31_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.67.fasta	3	56.8	91.35	0	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Gallionellaceae	Gallionella	Unclassified	11.8
32_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.18.fasta	3	65.6	85.33	2.49	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	Pseudolabrys	Unclassified	165.1
32_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.19.fasta	2	56.1	95.55	1.44	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Gao077554	Gao07554	Unclassified	Unclassified	10.6
32_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.22.fasta	2	60.9	71.49	1.26	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Hydrogenophilaceae	Unclassified	Unclassified	12.1
32_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.33.fasta	1	60.2	64.61	5.7	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Acidiferrobacteriales	Sulfurifustaceae	Sulfuricaulis	Unclassified	20.5
32_contigs_tot1.fasta_bin.1.3.fasta	1	62.6	81.03	0.94	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	Unclassified	Unclassified	13.5
331_contigs_tot.fasta_bin.1.3.fasta	2	63.2	50	1.72	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	Pseudolabrys	Unclassified	23.8



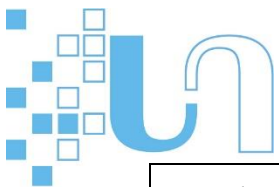
331_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.19.fa.fasta	2	56.9	90.16	0.95	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Gallionellaceae	Gallionella	Unclassified	11.2
332_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.16.fa.fasta	2	63.5	73.42	1.1	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	21-64-14	Unclassified	Unclassified	Unclassified	48.0
332_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.22.fa.fasta	1	63.1	60	0	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	Pseudolabrys	Unclassified	34.2
332_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.51.fa.fasta	2	62.2	96.98	2.1	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methyloligellaceae	Methyloceanibacter	Unclassified	25.3
351_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.16.fa.fasta	1	57.6	87.98	1.75	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Ga0077554	Ga007554	Unclassified	Unclassified	5.2
351_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.21.fa.fasta	4	56.2	97.11	1.03	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Gallionellaceae	Unclassified	Unclassified	41.1
351_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.28.fa.fasta	2	60.4	75.74	2.17	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Acidiferrobacteriales	Sulfurifustaceae	Sulfuricaulis	Unclassified	35.7
361_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.1.fa.fasta	3	61.2	91.12	0.86	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	Methylocapsa	Unclassified	9.4
421_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.3.fa.fasta	1	63.6	81.09	1.05	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	Pseudolabrys	Unclassified	23.6
421_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.4.fa.fasta	1	62.6	92.54	2.56	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	Palsa-892	Unclassified	10.9
51_contigs_tot.fasta_bin.2.8.fa.fasta	1	64.7	93.1	3.76	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	UBA1301	UBA1301	UBA6038	Unclassified	11.4



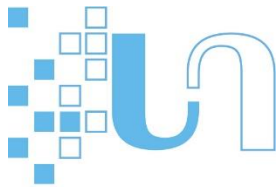
51_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.10.fa.fasta	1	64.9	71.02	1.47	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methyloligellaceae	Methyloceanibacter	Unclassified	15.0
51_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.15.fa.fasta	1	62.9	73.03	2.28	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	RBG-16-58-11	Unclassified	Unclassified	6.8
51_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.26.fa.fasta	2	66.2	97.38	2.53	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	Unclassified	Unclassified	22.8
51_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.31.fa.fasta	1	57.7	57.02	0.12	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Gallionellaceae	Gallionella	Unclassified	12.8
51_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.7.fa.fasta	1	55.9	91.28	1.76	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Gallionellaceae	UBA7399	Unclassified	9.2
31_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.80.fa.fasta	2	61.6	81.5	2.3	Bacteria	Spirochaetota	Spirochaetia	Spirochaetales	RBG-16-67-19	Unclassified	Unclassified	9.6
32_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.58.fa.fasta	2	62.0	54.13	2.27	Bacteria	Spirochaetota	Spirochaetia	Spirochaetales	RBG-16-67-19	Unclassified	Unclassified	19.8
363_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.3.fa.fasta	3	60.5	99.2	1.73	Bacteria	Spirochaetota	Spirochaetia	Spirochaetales	RBG-16-67-19	Unclassified	Unclassified	28.5
363_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.54.fa.fasta	2	63.4	88	0.03	Bacteria	Spirochaetota	Spirochaetia	Spirochaetales	RBG-16-67-19	Fen-1364	Unclassified	19.1
441_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.10.fa.fasta	3	61.5	68.67	3.6	Bacteria	Spirochaetota	Spirochaetia	Spirochaetales	RBG-16-67-19	Unclassified	Unclassified	25.5
33_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.47.fa.fasta	1	58.3	93.24	3.18	Bacteria	Verrucomicrobiota	Unclassified	Unclassified	Unclassified	Unclassified	Unclassified	25.2



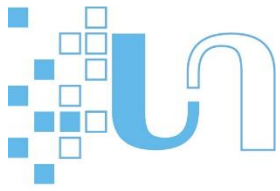
363_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.22.fa.fasta	1	59.7	90.78	3.38	Bacteria	Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	Pedosphaerales	Palsa-1400	Unclassified	Unclassified	12.7
381_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.44.fa.fasta	1	64.7	89.47	5.74	Bacteria	Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	Opitutales	Opitutaceae	Fen-1467	Unclassified	13.2
62_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.5.fa.fasta	2	57.0	83.56	4.71	Bacteria	Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	Pedosphaerales	Pedosphaeraceae	UBA11358	Unclassified	21.1
33_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.38.fa.fasta	1	38.9	55.25	0	Bacteria	WOR-3	UBA3072	UBA3072	UBA3072	Unclassified	Unclassified	6.2
363_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.60.fa.fasta	1	60.8	54.28	0	Bacteria	WOR-3	WOR-3	UBA2258	Unclassified	Unclassified	Unclassified	7.6
32_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.49.fa.fasta	1	45.4	97.74	2.2	Bacteria	Zixibacteria	MSB-5A5	GN15	PGXB01	Unclassified	Unclassified	9.8
333_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.45.fa.fasta	2	43.4	95.49	3.3	Bacteria	Zixibacteria	MSB-5A5	MSB-5A5	SM1-73	SM1-73	Unclassified	14.8
351_contigs_tot.fasta_bin.3.7.fa_Seqs_Level.5_CR_Taxon-UBA10806.fasta	1	46.1	59.28	3.3	Bacteria	Zixibacteria	MSB-5A5	UBA10806	4484-95	Unclassified	Unclassified	22.6
351_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.38.fa.fasta	1	43.4	70.39	1.1	Bacteria	Zixibacteria	MSB-5A5	MSB-5A5	RBG-16-43-9	RBG-16-43-9	Unclassified	20.4
422_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.10.fa.fasta	1	43.4	93.77	2.04	Bacteria	Zixibacteria	MSB-5A5	MSB-5A5	RBG-16-43-9	RBG-16-43-9	Unclassified	20.2
422_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.11.fa.fasta	2	43.3	95.54	3.85	Bacteria	Zixibacteria	MSB-5A5	MSB-5A5	SM1-73	SM1-73	Unclassified	20.7



441_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.22.fa.fasta	1	43.6	65.14	1.1	Bacteria	Zixibacteria	MSB-5A5	MSB-5A5	RBG-16-43-9	RBG-16-43-9	Unclassified	17.0
51_contigs_tot.pgbk.fasta_bin.11.fa.fasta	1	55.4	58.66	0	Bacteria	Zixibacteria	MSB-5A5	GN15	FEB-12	Unclassified	Unclassified	4.7



UNE APPROCHE GENOME-CENTREE ET UN RESEAU DE COOCCURRENCE REVELENT LE ROLE DES BACTERIES ET
DES ARCHEES DANS LA DEGRADATION DE LA MATIERE ORGANIQUE DANS UNE TOURBIERE PYRENEENNE
(BERNADOUZE, FRANCE)

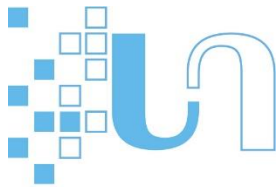


Partie VII. Discussion générale

VII.1. La diversité des microorganismes dans les tourbières pyrénéennes

L'étude des quatre tourbières pyrénéennes sélectionnées dans le cadre de cette thèse nous a permis de dresser un premier aperçu de la diversité des microorganismes de ces écosystèmes atypiques. Nous avons, par exemple, montré que les tourbières du Cap de la Ribereta (AYG₁, Aigüestortes, Espagne) et du Clots de l'Estany (CEST₁, Andorre) possédaient une diversité microbienne assez proche, à l'exception des Firmicutes dans les dernières strates de AYG₁ qui étaient absentes dans CEST₁. Nous avons également mis en évidence une abondance relativement élevée d'Acidobacteria en surface, suivies par les Alphaproteobacteria et les Gammaproteobacteria. À Encenrera (Andorre), les échantillons de surface étaient, quant à eux, majoritairement composés de Gammaproteobacteria, suivies par les Alphaproteobacteria et les Acidobacteria. Dans la tourbière de Bernadouze, les Acidobacteria et dans une moindre mesure les Proteobacteria étaient dominantes dans la plupart des échantillons. Parmi les Proteobacteria, l'abondance relative des Deltaproteobacteria n'a cependant pas montré de variation significative sur l'ensemble de la tourbière de Bernadouze contrairement à celle des Acidobacteria qui ont plutôt été rencontrées dans les buttes et les platières. De manière générale, Les Alphaproteobacteria et les Gammaproteobacteria n'étaient pas très abondantes à Bernadouze contrairement aux trois autres tourbières d'altitudes étudiées. Dans leur ensemble, ces résultats sont en accord avec les données de diversité observée dans d'autres tourbières échantillonnées à travers le monde, à quelques exceptions près cependant (voir le **Table II-1** dans II.3.2). Concernant les Actinobacteria, elles ont été retrouvées que dans les trois tourbières d'altitude corroborant ainsi d'autres observations faites dans les tourbières du permafrost (Hu et al., 2015; Müller et al., 2018; Yun et al., 2014), dans des tourbières minérotrophes du Canada (Seward et al., 2020), dans des tourbières acides de Russie (Moore et al., 2015) et dans des tourbières de Chine à pH proche de la neutralité (Deng et al., 2014; Zhou et al., 2017). En revanche, l'abondance relative des Verrucomicrobia est restée inférieure à 1% dans les quatre tourbières pyrénéennes, alors qu'elles ont été abondamment retrouvées dans des tourbières tropicales de Malaisie (Too et al., 2018), dans des tourbières de forêt aux États-Unis (Lin et al., 2014), dans des tourbières de montagne de République Tchèque (Chroňáková et al., 2019) et dans du permafrost en cours de dégel en Norvège (Müller et al., 2018).

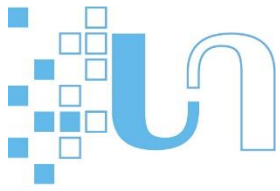
Concernant les échantillons de profondeur, les trois tourbières d'altitude ont montré des communautés microbiennes assez proches les unes des autres, avec une dominance claire des Chloroflexi, des Deltaproteobacteria et des Bacteroidetes. Seules les Crenarchaeota ont montré de fortes abondances à CEST₁. À Bernadouze, les deux phyla majoritaires étaient essentiellement les Crenarchaeota et les Chloroflexi et dans une moindre mesure les Deltaproteobacteria. À l'inverse, peu de Bacteroidetes ont été



retrouvées en profondeur sur Bernadouze. Les Chloroflexi montrent donc une forte structuration avec la profondeur dans l'ensemble des tourbières étudiées, ce qui n'est pas toujours le cas dans d'autres systèmes (Zhong et al., 2017). Par exemple, Zhou et al. (2017) ont mis en évidence une très forte abondance relative de Chloroflexi tout le long du gradient de profondeur. L'abondance relative des Crenarchaeota peut également être très variable entre tourbières. Par exemple, dans des tourbières minérotrophes de forêts du Minnesota, l'abondance relative des Crenarchaeota pouvait fluctuer entre 30 et 60% entre 50 et 175 cm de profondeur. Dans l'étude de Seward et al., 2020, qui a analysé la diversité microbienne de vingt tourbières en Amérique du Nord et au Canada sur 70 cm de profondeur, les Crenarchaeota ont également été rencontrés en faible nombre malgré la grande diversité de tourbières échantillonnées. Généralement, ce sont des Proteobacteria associées à des Acidobacteria, des Actinobacteria ou des Bacteroidetes qui dominaient dans leurs échantillons. Des membres des Euryarchaeota ont été retrouvés dans les basses-terres de la baie d'Hudson, un système de tourbières plutôt minérotrophe situé au Canada, ainsi que des buttes (i.e. palls) et des dépressions du permafrost de Stordalen, où leur abondance atteignait jusqu'à 50% de l'abondance totale (Mondav et al., 2017). Ce sont les deux seules études où les Euryarchaeota ont été décrites comme majoritaires dans les tourbières (voir le **Table II-1** dans II.3.2).

VII.2. L'influence des paramètres physico-chimiques sur la diversité microbienne dans les tourbières pyrénéennes

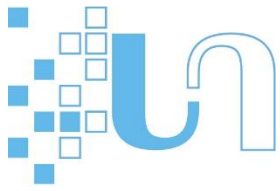
Dans la section précédente, nous avons vu que la distribution des microorganismes des tourbières pyrénéennes était influencée par la profondeur, avec des communautés majoritairement composées d'Acidobacteria et de Proteobacteria en surface et de Chloroflexi, de Deltaproteobacteria et de Crenarchaeota en profondeur. Sur les tourbières d'altitude (AYG₁, CEST₁ et ENC), un découpage des carottes tous les 4 cm en moyenne a permis de mettre en évidence des points de cassures dans l'abondance des microorganismes le long du gradient de profondeur, qui pourraient correspondre à l'acrotelm, le mésotelm et le catotelm. Ces trois horizons ont été également caractérisés par de fortes variations du ratio C/N, de la densité apparente et de la teneur en eau, reflétant ainsi différents degrés de décomposition de la matière organique. Comme attendu, nous avons donc observé une diminution de la diversité microbienne avec la profondeur. Cependant, nous avons aussi mis en évidence la présence d'un potentiel *hot-spot* de diversité dans le mésotelm dans AYG₁ et CEST₁ (mi-profondeur) faisant écho ainsi à des observations similaires effectuées dans des tourbières de Chine (Wang et al., 2019) et d'Amérique du Nord (Lin et al., 2014). Cet effet de la profondeur a également été révélé par l'influence majeure de la distance à la nappe sur les communautés microbiennes mise en évidence dans la partie 5, la distance à la nappe pouvant être utilisée comme proxy de la profondeur. En effet, à Bernadouze, onze des quinze groupes les



plus abondants étaient corrélés positivement à distance à la nappe. Cette observation entre en résonance avec la forte corrélation positive observée entre la distance à la nappe et la diversité alpha, un patron bien identifié dans de nombreuses tourbières (e.g. Wang et al., 2019; Zhong et al., 2017).

Nos résultats sur Bernadouze ont également montré que le pH était l'un des principaux facteurs influençant la distribution des bactéries et des archées. Le rôle du pH sur les communautés microbiennes du sol est aujourd'hui bien documenté bien que certaines études aient récemment remis en cause son influence (e.g. Hendershot et al., 2017). Concernant les tourbières, l'étude de Seward et al., (2020) a en effet démontré l'effet majeur du pH dans la structure des communautés à travers un transect latitudinal d'environ 1971 km en Amérique du Nord entre des valeurs variant de 3,98 à 7,75. À titre de comparaison, nous avons montré un effet du pH à Bernadouze dans la zone 5 entre des points distants seulement de quelques dizaines de mètres seulement avec des valeurs assez similaires à celles de Seward et al., (2020), et comprises entre 4,17 à 7,2. En effet, onze parmi les quinze groupes microbiens les plus abondants de Bernadouze étaient corrélés négativement ou positivement au pH. Parmi eux, les Acidobacteria et les Chloroflexi ont montré les plus fortes valeurs de corrélation. Bien que la dominance des Acidobacteria dans les tourbières acides ne soit plus à démontrer (Finn et al., 2020; Moore et al., 2015; Pankratov et al., 2011; Seward et al., 2020), il arrive pourtant que les Proteobacteria soient plus abondantes même à pH faible (Lin et al., 2014; Mondav et al., 2017; Müller et al., 2018; Too et al., 2018). Dans la zone acide de Bernadouze (Zone 3 à dominance de Sphaignes), les Acidobacteria étaient dominantes à toutes les profondeurs et dans tous les habitats (buttes, platières et dépressions). Concernant l'effet du pH, un des résultats les plus surprenants de notre étude sur Bernadouze reste la mise en évidence d'une relation en cloche entre le pH et la richesse en ASVs. Une explication possible de cette relation non-monotonique pourrait donc être un chevauchement des aires de répartition des espèces le long du gradient de pH vers le centre du gradient produisant ainsi un pic de richesse autour de pH 6, un phénomène rappelant l'effet du *mid-domain* (Colwell and Lees, 2000) originalement proposé pour expliquer le pic diversité rencontré à mi-altitude le long des gradients d'élévation. En d'autres termes, au centre du gradient, les espèces associées à de faibles pH se retrouvent à la limite haute de leur niche écologique tandis que les espèces associées à de plus fortes valeurs de pH se retrouvent à la limite basse de leur niche écologique, créant ainsi une hausse de la diversité mesurée.

En ce qui concerne plus précisément les Chloroflexi, l'influence du pH sur leur distribution n'avait été démontrée qu'à de rares occasions. Par exemple, Seward et al., 2020 ayant pourtant échantillonné 20 tourbières sur un large gradient de pH et à trois profondeurs distinctes (10–20, 30–40, 60–70 cm) ont retrouvé systématiquement des membres des Chloroflexi, mais en faible abondance. En revanche, Ivanova et al., 2020 ont récemment mise en évidence une augmentation des Chloroflexi en fonction du pH dans les



échantillons de surface, représentant seulement quelques pourcent dans des tourbières ombrotrophes, mais atteignant jusqu'à 30% de l'abondance relative totale des tourbières minérotrophes. À Bernadouze, nous avons montré que les Chloroflexi étaient fortement corrélées avec des pH proches de la neutralité et avec la profondeur. Des membres des Dehalococcoidia ont été retrouvés en forte abondance dans les trois profondeurs de la gouille, et dans les échantillons du bas de la butte et de la platière de la zone 2. Il s'agit de la zone possédant le plus fort pH, la plus forte concentration en nutriments, et l'un des plus forts rapport C/N. De façon étonnante, c'est aussi dans les échantillons du haut et du milieu de la butte de cette zone qu'une abondance inhabituelle des Gammaproteobacteria a été enregistrée. Tian et al., (2019) ont récemment montré que la distribution des Gammaproteobacteria pouvait être fortement dépendante de la végétation. Cela pourrait être la raison pour laquelle nous observons aussi sur Bernadouze une forte hétérogénéité des Gammaproteobacteria. La végétation de la tourbière ayant été documentée et des photographies de la végétation de chaque site d'échantillonnage ayant été prises, nous allons pouvoir tester cette hypothèse prochainement. Enfin, les membres du groupe 1.1c appartenant au phylum des Thaumarchaeota ont montré une forte corrélation négative avec le pH avec une distribution restreinte à la zone à sphaignes de Bernadouze. Les Thaumarchaeota ne font pas partie des groupes d'archées fréquemment retrouvés dans les tourbières (voir le **Table II-1** dans II.3.2), mais dans les rares tourbières où leur présence a été enregistrée, il s'agissait toujours de tourbières ombrotrophes (Lin et al., 2014; Moore et al., 2015).

VII.3. L'influence de la saison sur les microorganismes des tourbières

Lorsque nous avons mis en place le protocole d'échantillonnage pour Bernadouze, nous avons décidé de réaliser quatre campagnes étalées entre la fin du printemps et le début de l'automne dans le but de capturer de potentielles variations de diversité et de composition dans le temps, du moins sur notre période d'échantillonnage. L'impact des variations saisonnières sur la diversité et la composition des communautés microbiennes des tourbières a fait l'objet de peu d'études (Chroňáková et al., 2019) mais avait été essentiellement estimé via les activités enzymatiques et la production de CO₂. Bonnett et al., (2006) avaient par exemple observé un fort effet saisonnier du carbone organique dissous (COD), des composés phénoliques et de la respiration basale corrélés avec le pic estival des températures. Les lixiviats des litières, les exsudats racinaires et les produits de dégradation microbienne étant considérés comme les sources principales de COD (Piccolo, 1996), les plus fortes concentrations de COD avait été observées en été, lorsque l'activité microbienne était plus élevée (Guggenberger and Zech, 1992; Kaiser et al., 2001). Dans l'étude de Bonnett et al., 2006, les activités enzymatiques n'ont pas montré de réelles corrélations avec le COD mais plutôt avec la teneur en eau (corrélation positive), suggérant que l'activité microbienne

était contrôlée par d'autres facteurs abiotiques. Dans une étude récente, Maslov and Maslova, (2020) ont montré des variations saisonnières aussi bien en termes de respiration basale que de respiration induite par ajout de substrat. Cette fois, les valeurs maximales de respiration et de biomasse bactérienne ont été observées au début et à la fin de la saison de croissance (i.e. mai et octobre/novembre) corrélées avec l'humidité du sol et la teneur en nitrates.

Dans le cas de notre étude, nous n'avons pas observé de relation directe entre les campagnes d'échantillonnage, les variations de diversité et de composition des communautés microbiennes. Pourtant, dans un contexte plus général, une influence de la saison sur la composition des communautés microbiennes a déjà été mise en évidence dans une multitude d'écosystèmes, aussi bien dans l'environnement marin que dans les sols. Par exemple, dans des sols alpins du Colorado, il a été montré que les Acidobacteria étaient plus abondantes au printemps, les Actinobacteria et les Bacteroidetes en hiver, et une plus forte proportion de Verrucomicrobiota et de Proteobacteria en été (Lipson and Schmidt, 2004). L'effet indirect de la saison sur les microorganismes a été observé dans une forêt en Allemagne en réponse à des variations de pH (Thoms and Gleixner, 2013), dans des champs agricoles et des prairies en réponse à des variations de végétation (Habekost et al., 2008), et dans un verger en Chine en lien avec les variations de pH, de carbone total et d'azote (Luo et al., 2019).

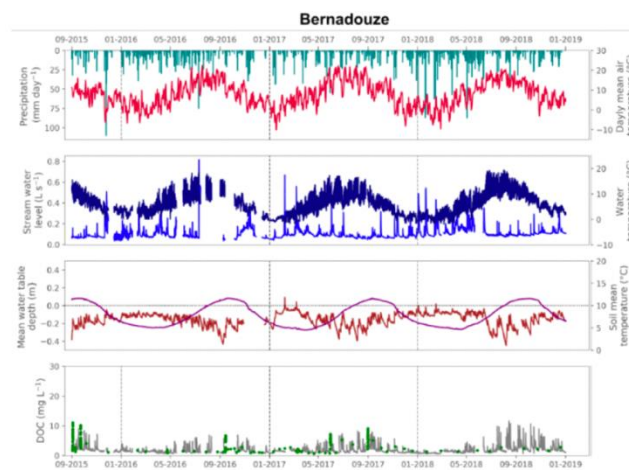
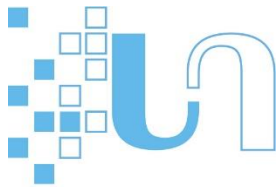


Figure VII.1. Variation saisonnière des paramètres physico-chimiques de Bernadouze.

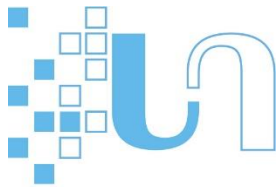
De haut en bas : précipitations et température de l'air, température du cours d'eau et niveau d'eau, concentration de COD à haute fréquence, variation moyenne de la profondeur de la nappe et température de l'eau de la tourbe. Séries temporelles observées à l'exutoire du fen Bernadouze du 1er septembre 2015 au 31 décembre 2018. Les lignes grises verticales représentent un changement d'année. Les points verts dans le quatrième panel font référence à la concentration de COD mesurée dans les échantillons d'eau ponctuelle et les échantillons d'inondation automatisés (Rosset et al., 2020).



À Bernadouze cependant, les données météorologiques et environnementales recueillies et assemblées dans la thèse de Thomas Rosset (Rosset, 2019) ont montré de fortes variations climatiques saisonnières avec une forte incidence sur la dynamique du carbone organique dissous (COD) et particulaire (COP). Il a par ailleurs été montré qu'à l'échelle saisonnière, la concentration de COD était expliquée par la température de l'eau, plus élevée en été. Durant les événements de forte chaleur, les fortes concentrations de COD étaient mesurées lorsque la nappe était proche de la surface, mais que d'une année à l'autre, les concentrations de COD étaient les plus élevées lorsque la profondeur de nappe était en moyenne plus basse. De façon tout aussi importante, il a montré que les variations de COD n'étaient pas liées à des événements de « décharge », dus à la fonte des neiges ou aux précipitations par exemple, suggérant que le COD était produit *in situ* et non accumulé au cours du temps. Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggèrent donc qu'il pourrait exister des variations saisonnières d'activités microbiennes, mais pas de variations de la structure des communautés. Des expériences complémentaires permettraient de confirmer ces résultats. Par exemple, des expériences d'incubation d'échantillons de tourbes de Bernadouze en conditions contrôlées permettraient d'étudier l'effet de paramètres clés tels que la température, la teneur en eau) sur la structure des communautés microbiennes. L'étude des ARNs pourrait également apporter un éclairage nouveau sur les variations spatio-temporelles en révélant parmi le pool de microorganismes présents si certains d'entre eux pourraient être plus actifs au sein des communautés microbiennes en fonction des périodes de l'année. Nous ne pouvons pas exclure aussi que l'approche de métagénomique ciblée ne permette pas d'avoir suffisamment de résolution pour révéler des variations d'abondance au cours des saisons.

VII.4. Acidobacteria, les dégradeurs primaires de polysaccharides à Bernadouze ?

Les Proteobacteria et les Acidobacteria sont les deux phylums les plus abondants de Bernadouze (697432 et 679299 des séquences respectivement, sur un total de 3748680 séquences). À eux seuls, ils représentent près d'un tiers de l'abondance totale des microorganismes de la tourbière. Sur Bernadouze, les Acidobacteria font parties du groupe microbien emblématique des conditions acides : elles sont dominantes à toutes les profondeurs et dans tous les habitats. Cependant, nos données ont montré qu'il existait de fortes variations au sein des ordres d'Acidobacteria le long du gradient de profondeur, révélant des niches écologiques spécifiques pour chacun des sous-groupes. Les Acidobacteriales (sous-groupe 1 : 3,13% des séquences totales) et les Solibacteriales (sous-groupe 3 : 2,62% des séquences) semblent effectivement dominer les couches de surface, alors qu'au milieu et en bas des carottes, ce sont les



membres du sous-groupe n°13 (i.e. 4,76% des séquences). À noter qu'une grande abondance d'Aminicenantales (Aminicenantia : 3,55% des séquences), une lignée d'Acidobacteria jusqu'alors rarement rencontrée dans les études de diversité, a été retrouvée exclusivement dans les platières à environ 1 m de profondeur. Des membres du sous-groupe 18, 17, 6, 11, 22, 15, ont également été identifiés, représentant respectivement 0,65%, 0,29%, 0,27%, 0,06%, 0,06%, 0,01% des séquences totales, ainsi que les sous-groupe 19, 5, 25 dont l'abondance totale était inférieure à 0,01%. Dans les tourbières, la présence des sous-groupe 1 et 4 (Pankratov et al., 2011), sous-groupe 1, 2 et 3 (Ivanova et al., 2020; Mondav et al., 2017), sous-groupe 1, 2 et 13 (Moore et al., 2015), sous-groupe 1 (Pankratov and Dedysh, 2010), sous-groupe 1, 2, 3 et 8 (Schmidt et al., 2015) a été fréquemment rapportée. Les Acidobacteria, sont connues pour être des hétérotrophes versatiles qui croissent de manière optimale à faible pH, produisent de grandes quantités d'enzymes extracellulaires et possédant un faible nombre de copies d'opéron d'ARNr suggérant un mode de vie oligotrophes (i.e. copiotrophe) (Eichorst et al., 2018; Kielak et al., 2016). À Bernadouze, leur distribution est principalement contrainte par le pH, la distance à la nappe et au rapport C:N.

Le séquençage métagénomique shotgun effectué sur 24 échantillons de Bernadouze a permis d'assembler 515 génomes possédant une complétude supérieure à 50 et une contamination inférieure à 5, dont 137 appartenant au phylum des Acidobacteria, représentant 80 génomes microbiens uniques. Parmi eux, 24 appartenaient à l'ordre des Acidobacteriales (sous-groupe 1, GC~58,96), 14 à l'ordre des Aminicenantales (sous-groupe non répertorié, GC~61,16), 14 à l'ordre des Bryobacterales (sous-groupe 3, GC~62,91), 2 à l'ordre des Thermoanaerobaculales (sous-groupe non répertorié, GC~68,48), 3 à l'ordre des UBA5066 (sous-groupe non répertorié, GC~68,89), 1 à l'ordre des UBA6911 (sous-groupe non répertorié, GC=57,94), 8 à l'ordre des UBA7540 (sous-groupe non répertorié, GC~59,82), 11 à l'ordre des UBA7541 (sous-groupe non répertorié, GC~59,18), 2 à l'ordre des Vicinamibacterales (sous-groupe non répertorié, GC~67,13), et 1 génome non répertorié au niveau de l'ordre (GC=55,11). Dans le chapitre n°6, nous avons utilisé dbcan, CAZy et PPR pour identifier les CAZymes chez les MAGs. Nous avons montré que les génomes d'Acidobacteria possédaient 45,5% des gènes codant les Carbohydrate Active enZymes retrouvées dans les génomes de Bernadouze, alors que les nombres d'enzymes retrouvés chez les Bacteroidetes (13,3%), les Chloroflexi (8,9%) et les Proteobacteria (8,5%) étaient beaucoup plus faibles.

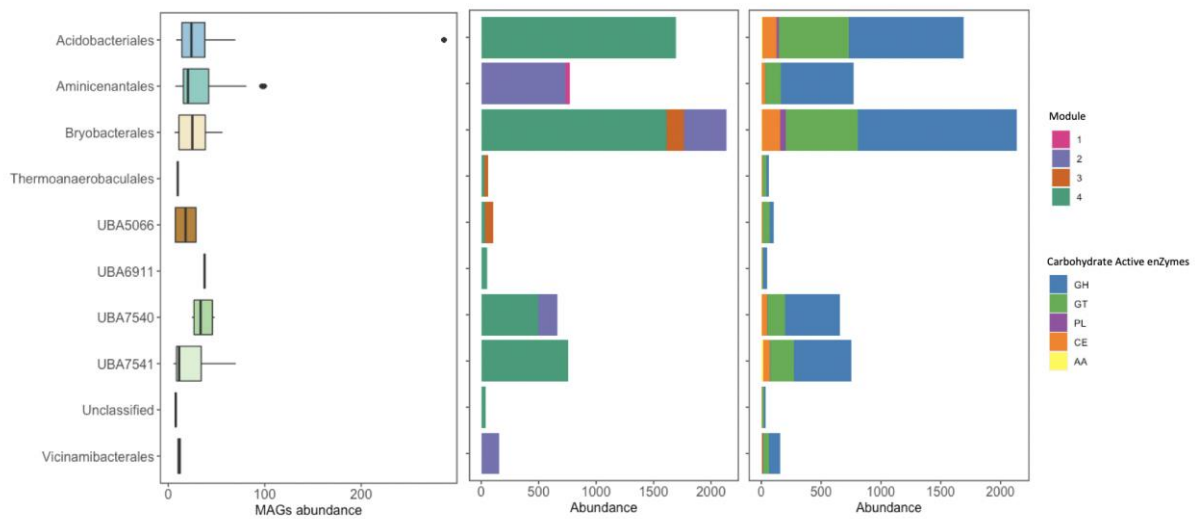
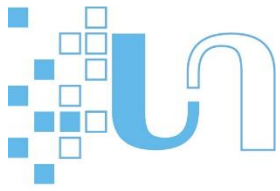


Figure VII.2. Carbohydrate Active enZymes présentes dans les génomes d'Acidobacteria.

Dans cette analyse, l'ensemble des génomes uniques appartenant aux Acidobacteria a été considéré ($n=80$). De gauche à droite : le premier graphique montre l'abondance estimée à partir des valeurs de recrutement de chacun des génomes au niveau de l'ordre. Le deuxième graphique montre la contribution de chaque ordre d'Acidobacteria aux CAZymes retrouvés dans chaque module ($n=4$). Le troisième graphique montre l'abondance de chaque sous-groupe d'enzymes CAZy ($n=5$) présent chez les Acidobacteria, classé au niveau de l'ordre.

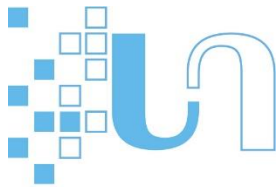
En moyenne, les génomes appartenant à l'ordre des UBA7540 sont ceux qui possèdent le plus fort recrutement à travers les métagénomes, suivis par les Bryobacteriales, les Acidobacteriales, les UBA5066, les Aminicenantales et les UBA7541. La majeure partie des CAZymes appartiennent à des microorganismes qui ont été principalement rencontrés en surface et à faible pH (voir module 4 du chapitre 6). Les Aminicenantales quant à eux codent environ 12% des Carbohydrate Active enZymes et ont été retrouvées à un pH proche de la neutralité, en dessous de la nappe (module 2). Les Bryobacteriales possèdent le plus de CAZyme (33,3%) suivies par les Acidobacteriales (26,4%), les Aminicenantales, les UBA7541 (11,8%) et les UBA7540 (10,3%). La majeure partie des gènes qui codent les Carbohydrate Active enZymes sont les Glycoside Hydrolase (GH, 62,9%), suivies des Glycosyl Transferases (GT, 28,8%), des Carbohydrate Esterases (CE, 6,8%), des Polysaccharides Lyases (PL, 1,1%) et des Auxiliary Activities (AA, 0,4%). Les GHs sont les enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques des longues chaînes d'hémicelluloses et de celluloses par exemple. Elles jouent un rôle crucial dans le cycle du carbone global



en permettant aux microorganismes du sol de décomposer les cellules végétales, en libérant du CO₂ par voie aérobie et divers produits de fermentation anaérobie (Bardgett et al., 2008). Les GTs représentent une sous-classe d'enzymes qui catalysent la synthèse de liaisons glycosidiques par le transfert d'un résidu de sucre d'un substrat donneur à un accepteur. Elles jouent un rôle clé dans les voies de biosynthèse des oligo et polysaccharides, ainsi que dans la glycosylation des protéines (Breton et al., 2006).

Sur les 355 classes de Carbohydrate Active enZymes, les enzymes retrouvées sont assez similaires chez chacun des ordres, avec 7,8% et 6,3% des enzymes retrouvées appartenant aux GT2 et de GT4 respectivement. Ces dernières sont impliquées dans la formation de polysaccharides de la paroi cellulaire de divers organismes y compris les bactéries, les archées, les champignons et les plantes, ainsi que de nombreux processus biologiques tels que la protection contre les agents pathogènes, la signalisation intercellulaire et la production de biofilm (Keenleyside et al., 2001). Beaucoup de GH13 (3,3%) ont été retrouvées, enzymes qui contribuent à la synthèse du tréhalose à partir de l'amidon, un composé utilisé à la fois par les plantes et les champignons pour stocker le carbone et l'énergie, ainsi que pour protéger les cellules bactériennes des stress physiques et chimiques (Howe et al., 2016). De même, les Acidobacteria possèdent un grand nombre de GH2 (4,5%), GH3 (5,2%) et GH29 (3,1%), des enzymes exo-hemicellulases permettant la formation de xylose à partir du xylobiose, des enzymes clés de la dégradation de l'hémicellulose (Bredon et al., 2018). Enfin, une forte abondance de GH23 (transglycosylase lytique, 3,5%) a été retrouvée, une classe d'enzyme probablement impliquée dans la dégradation de la cellulose (López-Mondéjar et al., 2016). Les Aminicenantales sont les seules qui possèdent des gènes codant des CAZymes différentes des autres Acidobacteria et la majeure partie d'entre elles n'a pas été régulièrement retrouvée dans l'environnement. Alors que les GH116 (2,9%) sont identifiées comme exo-hemicellulases impliquées dans la dégradation de l'hémicellulose (Bredon et al., 2018), les GH106 (α -L-rhamnosidases, 4,7%), GH127 (β -L-arabinofuranosidase, 4,0%), les GH38 (α -mannosidase, 5,7%) ont une fonction inconnue dans l'environnement (Cobucci-Ponzano et al., 2010; Mensitieri et al., 2018; Tasuku, 2014).

La capacité des Acidobacteria à dégrader la matière organique avait été observée chez des souches cultivables appartenant aux subdivisions 1 et 3 (Eichorst et al., 2007; Pankratov and Dedysch, 2010; Whang et al., 2014) mais rarement observée *in situ*. Des données de métagénomique associées à la métaprotéomique ont permis de montrer que les Acidobacteria codaient et exprimaient la majeure partie des cellulases et des xylanases dans le permafrost en cours de dégel de Stordalen (Woodcroft et al., 2018), suggérant que les Acidobacteria pourraient être les dégradeurs primaires à cet endroit. Des échantillons prélevés dans une paire de la réserve Angelo Coast Range dans le nord de la Californie, ont révélé que les Acidobacteria possédaient la plus grande abondance et diversité de CAZymes et exprimaient une forte proportion de carbohydre esterases (Diamond et al., 2019).

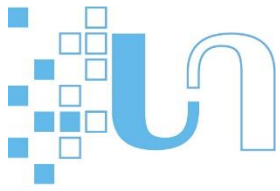


Ensemble, ces résultats suggèrent donc que les Acidobacteria pourraient être les dégradeurs primaires de Bernadouze, mais des analyses complémentaires seraient nécessaires avant de pouvoir l'affirmer. En effet, les champignons sont connus pour participer activement à la dégradation de polysaccharides dans l'environnement (Berlemont, 2017) et dans les tourbières (Juan-Ovejero et al., 2020). Dans les tourbières à Sphaignes, les champignons saprotrophes sont capables de dégrader la lignine et la cellulose et jouent un rôle crucial dans le cycle du carbone (Rice et al., 2006). Un bas niveau de la nappe aurait tendance à augmenter l'abondance des champignons saprotrophes, pouvant augmenter les activités enzymatiques de dégradation du carbone et, par conséquent, augmenter considérablement la décomposition de la matière organique dans les tourbières (Jassey et al., 2018). Les champignons sont plus adaptés aux sols à faible disponibilité de nutriments que les bactéries (Wardle et al., 2004). Dans les tourbières de basse altitude, l'oxygénation augmente la dominance des champignons par rapport aux bactéries (Bragazza et al., 2015). Une biomasse fongique plus élevée que celle des bactéries a été observée dans les tourbières à pH faible et à rapport C:N élevé (Golovchenko et al., 2007; Jaatinen et al., 2007) ainsi que dans les tourbières enneigées de montagne (Robroek et al., 2013). Inversement, une forte dominance des bactéries sur les champignons a été observée dans trois tourbières contrastées du Canada, aussi bien dans des tourbières ombrotrophes que minérotrophes (Winsborough and Basiliko, 2010).

Ainsi, l'importance des champignons dans la dégradation de la matière organique par rapport à celle des bactéries reste floue, et des études complémentaires sont nécessaires. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons également effectué le séquençage de l'ensemble des échantillons collectés (i.e. 248) avec des amorces 18S. Nous allons ainsi pouvoir dans un futur proche décrire la diversité des Eukaryotes et plus particulièrement celle des champignons dans les quatre tourbières pyrénéennes et étudier les liens entre la diversité des champignons avec l'ensemble des paramètres environnementaux mesurés. Nous allons ainsi pouvoir faire l'analyse de la structure des communautés de champignons à travers quatre tourbières pyrénéennes. Nous allons également pouvoir tester l'influence de la saison, des habitats et de la profondeur sur ces communautés.

VII.5. Modèle conceptuel du rôle des microorganismes dans le cycle du carbone de la tourbière de Bernadouze

Les microorganismes jouent un rôle clé dans le fonctionnement des écosystèmes. En dégradant la matière organique produite par les plantes via des enzymes extracellulaires, ils vont produire du CO₂ par respiration aérobie ou par fermentation en condition anaérobie. Le rôle des microorganismes dans les tourbières est



cependant modulé par un grand nombre de forçages environnementaux. En effet, les tourbières étant globalement saturées en eau, les conditions y sont principalement anoxiques. De plus, le pH acide associé aux faibles concentrations en nutriments et aux composés inhibiteurs (i.e. phénols) contribue à ralentir l'activité microbienne. Le carbone y est donc davantage stocké que respiré. Ainsi, les paramètres environnementaux influencent le stockage de carbone et la production de CO₂. Le CO₂ produit par les communautés microbiennes peut être estimé en laboratoire par des mesures de respiration induite par ajout de substrat (respiration potentielle) ou, dans le meilleur des cas, par des mesures de flux *in situ*. Le carbone stocké peut être estimé soit par le carbone organique total (combustion de la matière organique) qui représente l'ensemble du carbone organique stocké, aussi bien par les plantes que par les microorganismes. Le Carbone Organique Dissous (COD) peut aussi être utilisé pour étudier la dynamique du carbone. Dans l'article de Ponnamperna, 1972, il est mentionné qu'en conditions anaérobies, le métabolisme de fermentation domine, entraînant la production de composés COD, plutôt que la production rapide de CO₂. Néanmoins, le COD résulte également de l'activité des plantes (lixiviats des litières, exsudats racinaires) et son utilisation comme résultante du fonctionnement du système tourbière nécessiterait une étude plus approfondie. L'apport essentiel de notre étude à ce schéma de fonctionnement repose sur la quantification fine de la diversité microbienne (procaryotes dans un premier temps bien que les données eucaryotes soient déjà disponibles). Il serait pertinent de modéliser la dégradation de la matière organique dans les tourbières en intégrant un certain nombre de métriques décrivant la diversité et la composition des communautés microbiennes afin de tester leur rôle dans les interactions environnements-fonctionnement. Nous pourrions inclure également la biomasse microbienne qui joue également un rôle essentiel dans les processus de dégradation de la matière organique. Des valeurs de biomasses bactériennes et fongiques ont été acquises dans le cadre du stage de Master 2 d'Ivan Gonzalez Alvarez (Direction Béatrice Lauga et Etienne Richy). L'ensemble de ces variables pourrait ainsi permettre de quantifier le rôle de la diversité des microorganismes dans le stockage et le relargage de carbone. Enfin, l'utilisation des données d'activités enzymatiques (phénol oxydases, peroxydases, β -glucosidases, phosphatases et chitinases) acquises sur chacun des échantillons de Bernadouze pourrait aussi permettre d'affiner le rôle fonctionnel des communautés microbiennes dans le modèle. Un schéma synthétique du fonctionnement de Bernadouze est présenté en **Figure VII.3**. Nous proposons d'utiliser une modélisation par équations structurelles (SEM) pour analyser les liens de causalité entre les différentes familles de variables incluses dans le modèle.

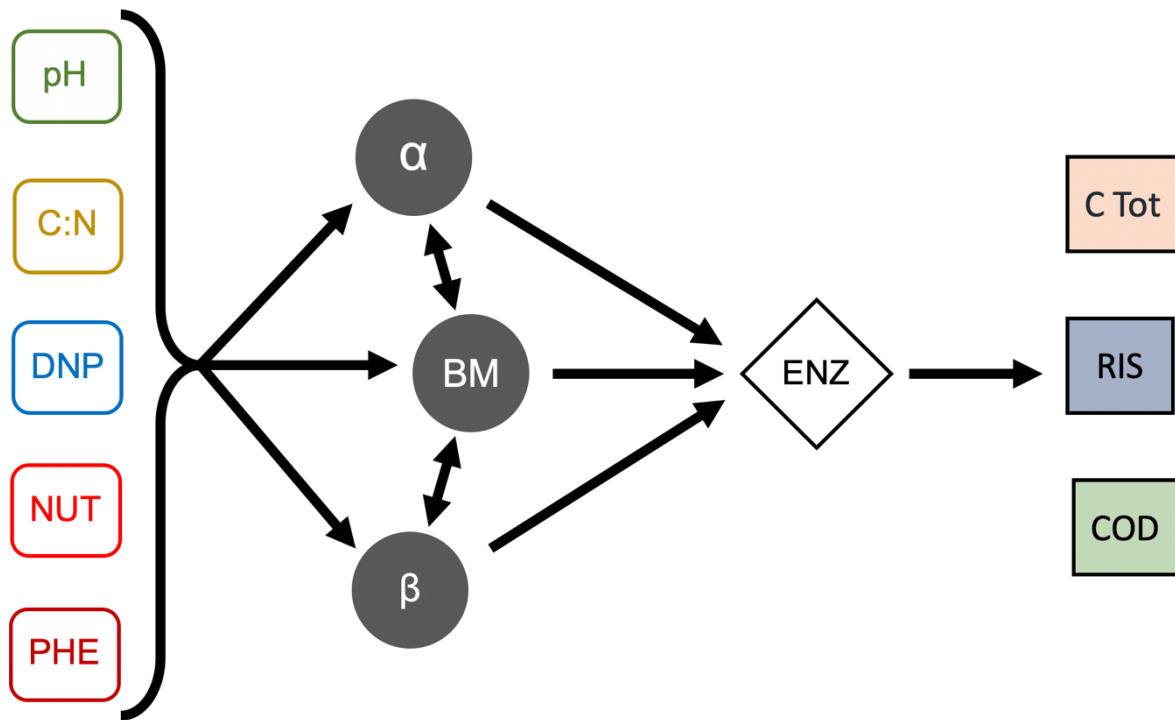
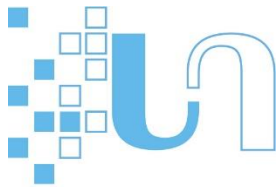


Figure VII.3. Schéma conceptuel simplifié du fonctionnement dans la tourbière de Bernadouze.

Ce modèle évalue l'effet de la variation des paramètres environnementaux sur le stockage et relargage du carbone tout en prenant en compte le rôle de la diversité (alpha) et de la composition (beta) des communautés microbiennes ainsi que de la biomasse et de l'activité microbienne. Abréviations : NUT = concentrations en nutriments, DNP = distance à la nappe, PHE = phénols, C:N = ratio Carbone sur Azote, α = alpha diversité, β = beta diversité, BM = biomasse, ENZ = activité enzymatiques, C Tot = carbone total, RIS = respiration induite par ajout de substrat, COD = Carbone Organique Dissous.

VII.6. La méthanogenèse dans les tourbières pyrénéennes

Une faible abondance de méthanogènes a été identifiée dans les tourbières pyrénéennes de notre étude. Dans les tourbières andorranes et espagnoles, les Euryarchaeota ne représentaient que 1,59% du total des séquences. C'est dans la tourbière du Clots de l'Estanyo que la plus faible abondance d'Euryarchaeota a été observée (CEST₁, 1,00%), suivie par la tourbière du Cap de la Ribereta (AYG₁, 1,15%) et un peu plus de deux fois plus d'Euryarchaeota ont été enregistré à Encenrera (ENC, 3,39%). La hauteur de la nappe proche de la surface à ENC (-10cm) explique très certainement ce résultat (White et al., 2008). Les membres de la classe des Methanomicrobia étaient les plus abondants, représentant 1,14% du total des séquences, appartenant principalement à l'ordre des Methanomicrobiales (0,70%) et des Methanosarcinales (0,43%). Les Euryarchaeota étaient légèrement plus abondantes en moyenne à Bernadouze (2,33% total des



séquences), d'avantage dans la zone 4 (3,10%), que dans la zone 5 (2,94%), la zone 2 (2,72%), la zone 3 (1,67%) et la zone 1 (1,19%). Les Euryarchaeota n'ont pas montré de structure à travers les habitats, avec un nombre de séquences moyen de 2,67% dans les platières, 2,25% dans les gouilles et 2,05% dans les buttes. Cette fois encore, ce sont les Methanomicrobia qui étaient les plus abondantes (1,32%), appartenant principalement à l'ordre des Methanomicrobiales (0,94%) et des Methanosarcinales (0,37%). Ces résultats sont en accord avec d'autres études rapportant que les Methanomicrobiales et dans une moindre mesure, les membres des Methanobacterales hydrogénotrophiques et des Methanosarcinales acétoclastiques sont d'importants contributeurs à la production de CH₄ dans les tourbières (Cadillo-Quiroz et al., 2006; Juottonen et al., 2005; Lin et al., 2012; Martini et al., 2006).

Généralement, les Euryarchaeota ne sont pas retrouvées en grande quantité dans les tourbières (voir le **Table II-1**), ce qui est un résultat surprenant si on considère que les tourbières participent activement à l'émission de CH₄ dans l'atmosphère, estimée annuellement à 46 Tg de CH₄-C (Gorham, 1991). Néanmoins, les données métagénomiques révèlent que le génome le plus abondant au sein de la tourbière de Bernadouze est une lignée de méthanogène (abondance relative cumulée basée sur le recrutement > 300 RPKG). Bog-38 a été assemblé dans les métagénomiques de la zone 3 (pH acide) et son abondance varie en fonction de la profondeur de la nappe. En effet, il est d'abord abondant dans la zone de transition de la nappe au printemps, puis devient plus abondante à 1 m de profondeur en été. Affilié au phylum des Halobacteriota via la classification de GTDB et possédant plusieurs gènes permettant l'adaptation au milieu salin (TrkA, MscS) et aux UVs (c'est-à-dire KatG, PhrB, UvrABC, MutY, AlkA, RadA), nous avons d'abord pensé qu'il s'agissait d'une Haloarchaea méthanogène (Evans et al., 2019; Martijn et al., 2020). Or, après une étude plus approfondie de la phylogénie de GTDB, il se trouve que le génome est finalement placé entre les Methanosarcinales et les Methanomicrobiales. L'annotation des gènes a permis de révéler que ce sont des méthanogènes hydrogénotrophes, utilisant fwdABCD ou cdhABCDE pour réduire le CO₂, mais la présence du gène codant pour l'acétyl-CoA synthétase (AMP-forming) permettant d'activer l'acétate (Evans et al., 2019), suggère que Bog-38 pourrait être également capable d'utiliser l'acétate. De plus, cette lignée possède des gènes codant pour l'alcool déshydrogénase et de l'aldéhyde déshydrogénase, permettant de produire de l'acétate comme substrat pour la méthanogénèse. Deux génomes appartenant à l'ordre des Methanomicrobiales ont été assemblés dans les métagénomiques issus d'échantillons caractérisés par un pH proche de la neutralité. Beaucoup moins abondants (recrutement moyen = 19.36 RPKG), ces génomes possèdent les mêmes gènes que Bog-38, suggérant que ces microorganismes auraient la capacité d'utiliser l'acétate ou H₂/CO₂ lorsque les conditions sont limitantes. Des gènes codant pour la lactate déshydrogénase ont également été retrouvés.

Néanmoins, nos connaissances sur Bog-38 restent à ce jour très limitées car un bon nombre de gènes n'ont pas été encore annotés avec succès. L'isolement de cette souche permettrait d'en connaître un peu plus sur sa physiologie et ses capacités métaboliques.

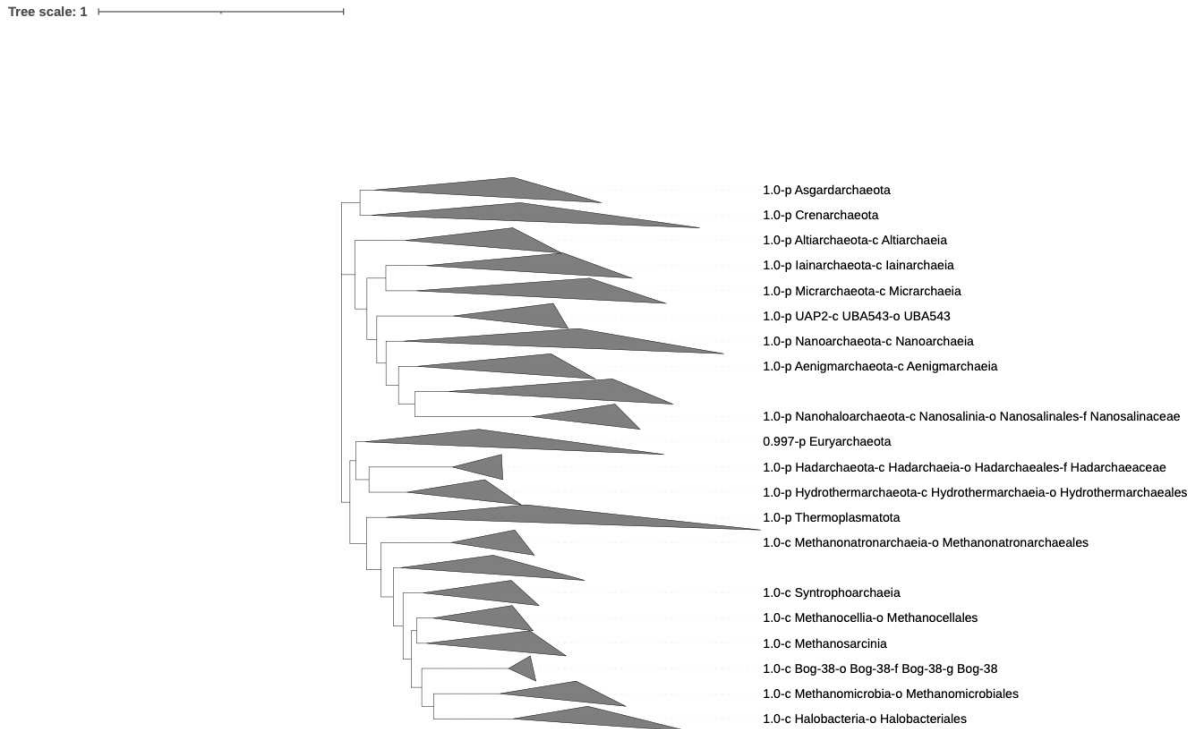


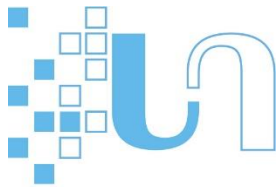
Figure VII.4. Position de Bog-38 et Methanomicrobiales dans l'arbre phylogénomique des Archées.

L'arbre phylogénétique a été calculé via GTDB-tk, qui utilise la méthode du maximum de vraisemblance pour classer chaque génome en fonction de son emplacement dans l'arbre de référence, de sa divergence évolutive relative et/ou de l'identité nucléotidique moyenne (ANI) par rapport aux génomes de référence. L'arbre a été estimé sur la base de la phylogénie concaténée de 122 gènes marqueurs d'Archeae à copie unique.

Abréviations : p = phylum, c = classe, o = ordre ; f = famille, g = genre.

VII.7. Partenariat hôte-Nanoarchaeota étudié par approche génomique

De nombreuses lignées peu séquencées et peu décrites ont été identifiées à travers ces trois études menées ces trois années. Parmi elles, des séquences classées chez les Nanoarchaeota ont été identifiées



aussi bien dans les tourbières andorranes et espagnoles (1,20% des séquences totales) qu'à Bernadouze (1,50%). Sur la base d'études de metabarcoding, la présence de Nanoarchaeota a été documentée dans divers habitats, tels que dans des milieux hypersalins et des sédiments d'origine diverse en Asie, Océanie, Amérique du Sud et Afrique (Casanueva et al., 2008), des sources chaudes acides en Russie (Mardanov et al., 2018), et des cheminées hydrothermales (Hohn et al., 2002; Inskeep and McDermott, 2013; McCliment et al., 2006) (**Figure VII.5**). Cependant, aucune étude n'a mentionné leur présence dans les tourbières. En outre, aucun des hôtes précédemment identifiés dans d'autres études n'est caractéristique des tourbières suggérant donc que les hôtes des Nanoarchaeota dans cet environnement sont différents de ces derniers. La présence de ces microorganismes et leur rôle dans cet environnement mérite donc toute notre attention. Lauréat de l'appel d'offre E2S-UPPA « Post-doctorate of excellence-2020 » j'ai proposé de poursuivre les investigations menées sur ces microorganismes durant ma thèse. Le projet d'une durée d'un an propose d'étudier les Nanoarchaeota dans les tourbières, d'identifier de nouveaux hôtes et, potentiellement, de nouvelles capacités métaboliques. Ce projet sera développé en collaboration avec le Professeur Phil Hugenholtz (directeur de l'Australian centre for Ecogenomics, The University of Queensland, Australie).

Les Nanoarchaeota sont des ectosymbiontes obligatoires qui ont été isolés et cultivés pour la première fois à partir d'échantillons de cheminées hydrothermales marines. Avec une taille comprise entre 300 à 650 kbp, ils possèdent le plus petit génome de l'embranchement des Archées (Huber et al., 2002; Munson-McGee et al., 2015; Wurch et al., 2016). Qualifiés de « streamlined », ces génomes plus petits possèdent moins d'ADN non-codant et moins de gènes non essentiels (Giovannoni et al., 2014). Ces microorganismes se développent attachés à la surface de leur hôte (**Figure VII.5**) en contact étroit avec le système endomembranaire, ils peuvent exploiter les métabolites essentiels générés par leur hôte telles que les acides aminés, les nucléotides, les lipides et les cofacteurs (Giannone et al., 2011; Hamerly et al., 2016; Heimerl et al., 2017). À ce jour, les seuls hôtes de Nanoarchaeota ayant été identifiés appartiennent au phylum des Crenarchaeota (Huber et al., 2002; Podar et al., 2013; Wurch et al., 2016).

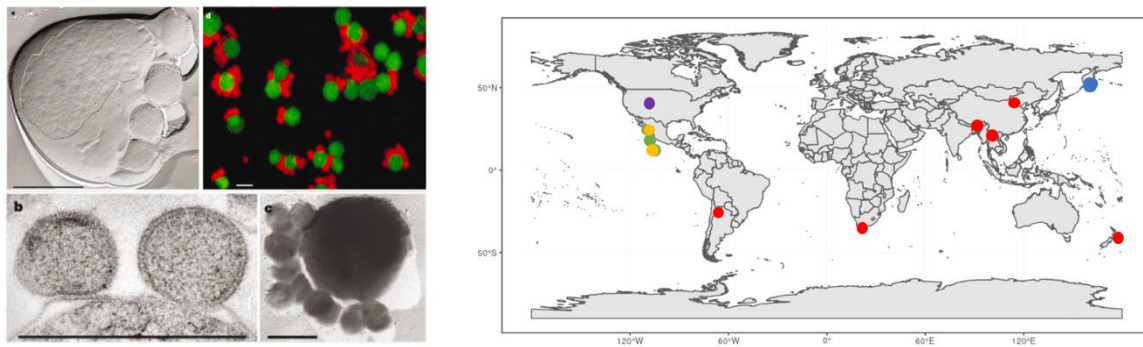
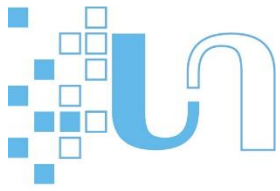


Figure VII.5. *Nanoarchaeum equitans* - *Ignicoccus* sp en co-culture (droite) observées par microscopie électronique et microscopie à fluorescence (Huber et al., 2002). À gauche, distribution des études menées sur les Nanoarchaeota dans différents environnements.

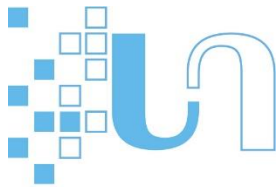
(source : Casanueva et al., 2008 (rouge); Hohn et al., 2002 (vert); Inskeep and McDermott, 2013 (violet); Mardanov et al., 2018 (bleu); McCliment et al., 2006 (jaune))

À Bernadouze, l'abondance des Nanoarchaeota représente 1,50% du nombre total des séquences, et une analyse plus approfondie de nos données a révélé une importante structuration spatiale des Nanoarchaeota, étant à la fois influencées par les types d'habitat (buttes, platières et gouilles) et le pH. De plus, l'abondance de Nanoarchaeota et de Crenarchaeota est fortement corrélée ($r= 0,7, p < 0,001$, corrélation de Spearman). Soixante-dix-sept génomes de Crenarchaeota de bonne qualité ont été assemblés à Bernadouze, alors que nous n'avons pas pu reconstituer de MAG de Nanoarchaeota. Une des explications possibles est la mauvaise estimation de la complétude et de la contamination des génomes de Nanoarchaeota. En effet, pour générer des génomes, des millions de séquences de 150 pb sont d'abord assemblées en plusieurs contigs (plusieurs centaines ou milliers de pb) puis en MAG. Cette méthode est basée sur une approche statistique prenant en compte un certain nombre de paramètres tels que la signature des tétranucléotides, la couverture et le contenu en GC. L'ajout de contigs ayant une signature très proche (fréquence des tétranucléotides, teneur en GC) ou un taux de recouvrement trop faible sont des sources d'erreur fréquentes, entraînant une faible complétude ou un taux de contamination élevé. Cette limite dans l'assemblage du génome peut être estimée à l'aide de l'outil CheckM (Parks et al., 2015), qui permet d'estimer la complétude et la contamination des génomes. Pour qu'un génome soit considéré comme suffisamment informatif et ajouté dans une base de données de référence, il doit atteindre un taux de complétude $> 50\%$ et un taux de contamination $< 5\%$ (Parks et al., 2017). Pour cela, CheckM déduit la position des génomes dans un arbre de référence et utilise des gènes marqueurs spécifiques à la lignée pour estimer l'exhaustivité et la contamination (Parks et al., 2015). Il s'agit principalement de gènes



impliqués dans la machinerie cellulaire (par exemple la protéine ribosomique, l'ARN polymérase). En raison des caractéristiques particulières des Nanoarchaeota (génome simplifié, symbiote obligatoire), certains de ces gènes peuvent être manquants dans les génomes que nous avons reconstruits à Bernadouze. Ainsi, ce projet propose de développer un outil bioinformatique qui prendra donc en compte les paramètres génétiques spécifiques à cet embranchement tels que la fréquence des tétranucléotides et le contenu en GC pour améliorer la récupération de génomes de Nanoarchaeota.

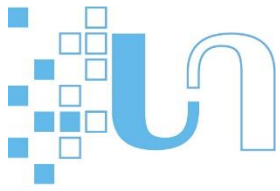
En outre, il a récemment été démontré que la gamme d'hôtes potentiels des Nanoarchaeota pourrait être beaucoup plus étendue que ce qui avait été identifié précédemment, et les études dans ce domaine restent rares (Jarett et al., 2018). Comme les Nanoarchaeota ont accès à des sources externes d'ADN, et notamment par transfert horizontal de gènes avec leurs hôtes (Jarett et al., 2018), une annotation et une recherche approfondie des gènes présents dans le génome des Nanoarchaeota pourraient permettre d'identifier de nouveaux hôtes. Ainsi, après l'assemblage des génomes de Nanoarchaeota, il est prévu d'annoter leurs gènes pour permettre l'identification d'hôtes potentiels, qui fournira de nouvelles informations sur les capacités métaboliques de cet embranchement. *In fine*, nous espérons pouvoir apporter plus d'information sur les relations qu'entretiennent les Nanoarchaeota avec leur hôte (parasitisme vs. syntrophie).



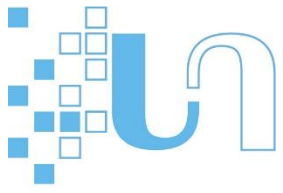
Conclusion générale

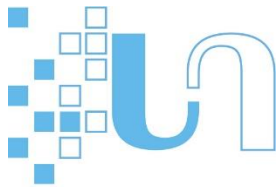
De manière générale, les travaux présentés dans cette thèse ont contribué à une meilleure description et compréhension de la diversité microbienne procaryote au sein des tourbières de montagne dans les Pyrénées. L'étude de trois tourbières d'altitude a permis de mettre en évidence différentes hypothèses quant aux facteurs clés influençant les variations de diversité et de composition des communautés microbiennes au sein des tourbières. Tout d'abord, la profondeur (comme proxy de la distinction en zone oxygène et anoxygène) est apparue comme le facteur majeur de la répartition et de la fonctionnalité des communautés microbiennes même si nos résultats ont pu mettre en évidence l'effet d'autres paramètres tels que la densité apparente et le rapport carbone/azote sur les variations de diversité à une plus fine échelle spatiale le long des profils de profondeur. Une analyse exhaustive de la diversité microbienne et de ses déterminants dans le temps et dans l'espace sur la tourbière de Bernadouze a révélé l'importance du pH (reflet partiel du gradient ombrotrophe-minerotrophe dans la tourbière), de la distance à la nappe (séparation entre zones oxygène et anoxygène) et du rapport carbone/azote (indicateur de l'état de dégradation de la matière organique) sur répartition à la fois horizontale et verticale de ces communautés. Ainsi, les fluctuations environnementales dans les trois dimensions spatiales entraînent une structuration forte des communautés microbiennes procaryotes des tourbières. Ces travaux ont également permis de mettre en évidence pour la première fois la présence de Nanoarchaeota. La présence de ces microorganismes et leur rôle dans cet environnement mérite donc toute notre attention et fera prochainement l'objet de recherche développée en collaboration avec le Professeur Phil Hugenholtz (Australian center for Ecogenomics, University of Queensland, Australie). L'analyse métagénomique effectuée lors de cette thèse a également permis de souligner l'importance potentielle des Acidobacteria dans le fonctionnement des tourbières suggérant qu'elles pourraient être les dégradeurs primaires les plus importants dans la tourbière de Bernadouze.

Durant cette thèse, différents types de données ont été collectées qui n'ont pas encore fait l'objet d'analyses approfondies. Nous avons par exemple obtenu les données de diversité sur les Eucaryotes pour les 248 échantillons collectés sur les quatre tourbières étudiées et une analyse comparative entre Procaryotes et Eucaryotes pourrait permettre ainsi de dresser un panorama beaucoup plus large de la diversité microbienne de ces écosystèmes. De plus, l'utilisation des données de biomasse bactérienne et fongique couplée avec des données d'activités enzymatiques acquises durant la thèse pourrait permettre dans un futur proche de développer des approches plus fonctionnelles pour tenter de mieux comprendre les interactions complexes entre environnement, diversité et activités dans le stockage du carbone dans les tourbières.



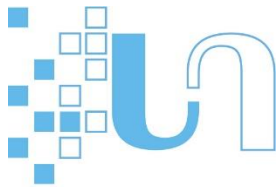
De plus, l'effet du réchauffement climatique sur la diversité microbienne des tourbières n'a pas été explicitement abordé durant cette thèse. Le changement climatique étant une préoccupation majeure à l'échelle du massif des Pyrénées, nous souhaiterions également dans le cadre de projets futurs, inférer l'incidence d'une augmentation de température réaliste *in situ* sur la diversité microbienne, et plus généralement sur le fonctionnement des tourbières pyrénéennes. Pour cela, nous pourrions mettre en place des systèmes tels que des chambres à ciel ouvert (OTC, Open Top Chambers).



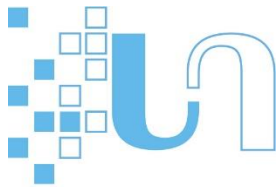


Références bibliographiques

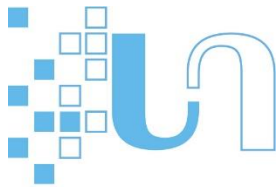
- Abdalla, M., Hastings, A., Truu, J., Espenberg, M., Mander, Ü., Smith, P., 2016. Emissions of methane from northern peatlands: a review of management impacts and implications for future management options. *Ecol. Evol.* 6, 7080–7102. <https://doi.org/10.1002/ece3.2469>
- Allen, S., Allen, D., Phoenix, V.R., Le Roux, G., Durántez Jiménez, P., Simonneau, A., Binet, S., Galop, D., 2019. Atmospheric transport and deposition of microplastics in a remote mountain catchment. *Nat. Geosci.* 12, 339–344. <https://doi.org/10.1038/s41561-019-0335-5>
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs 14.
- Anderson, R.L., Foster, D.R., Motzkin, G., 2003. Integrating lateral expansion into models of peatland development in temperate New England. *J. Ecol.* 91, 68–76. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2003.00740.x>
- Antipov, D., Korobeynikov, A., McLean, J.S., Pevzner, P.A., 2016. hybridSPAdes: an algorithm for hybrid assembly of short and long reads. *Bioinformatics* 32, 1009–1015. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv688>
- Banerjee, R.D., Sen, S.P., 1979. Antibiotic Activity of Bryophytes. *The Bryologist* 82, 141. <https://doi.org/10.2307/3242073>
- Bardgett, R.D., Freeman, C., Ostle, N.J., 2008. Microbial contributions to climate change through carbon cycle feedbacks. *ISME J.* 10.
- Belyea, L.R., 1996. Separating the Effects of Litter Quality and Microenvironment on Decomposition Rates in a Patterned Peatland. *Oikos* 77, 529. <https://doi.org/10.2307/3545942>
- Berlemont, R., 2017. Distribution and diversity of enzymes for polysaccharide degradation in fungi. *Sci. Rep.* 11.
- Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J.E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C.J., Brown, C.T., Callahan, B.J., Caraballo-Rodríguez, A.M., Chase, J., Cope, E.K., Da Silva, R., Diener, C., Dorrestein, P.C., Douglas, G.M., Durall, D.M., Duvallet, C., Edwardson, C.F., Ernst, M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J.M., Gibbons, S.M., Gibson, D.L., Gonzalez, A., Gorlick, K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S., Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G.A., Janssen, S., Jarmusch, A.K., Jiang, L., Kaehler, B.D., Kang, K.B., Keefe, C.R., Keim, P., Kelley, S.T., Knights, D., Koester, I., Kosciulek, T., Kreps, J., Langille, M.G.I., Lee, J., Ley, R., Liu, Y.-X., Loftfield, E., Lozupone, C., Maher, M., Marotz, C., Martin, B.D., McDonald, D., McIver, L.J., Melnik, A.V., Metcalf, J.L., Morgan, S.C., Morton, J.T., Naimey, A.T., Navas-Molina, J.A., Nothias, L.F., Orchanian, S.B., Pearson, T., Peoples, S.L., Petras, D., Preuss, M.L., Pruesse, E., Rasmussen, L.B., Rivers, A., Robeson, M.S., Rosenthal, P., Segata, N., Shaffer, M., Shiffer, A., Sinha, R., Song, S.J., Spear, J.R., Swafford, A.D., Thompson, L.R., Torres, P.J., Trinh, P., Tripathi, A., Turnbaugh, P.J., Ull-Hasan, S., van der Hoof, J.J.J., Vargas, F., Vázquez-Baeza, Y., Vogtmann, E., von Hippel, M., Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber, K.C., Williamson, C.H.D., Willis, A.D., Xu, Z.Z., Zaneveld, J.R., Zhang, Y., Zhu, Q., Knight, R., Caporaso, J.G., 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 37, 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>



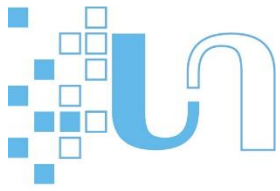
- Bonnett, S.A.F., Ostle, N., Freeman, C., 2006. Seasonal variations in decomposition processes in a valley-bottom riparian peatland. *Sci. Total Environ.* 370, 561–573.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.08.032>
- Børsheim, K.Y., Christensen, B.E., Painter, T.J., 2001. Preservation of fish by embedment in Sphagnum moss, peat or holocellulose: experimental proof of the oxopolysaccharidic nature of the preservative substance and of its antimicrobial and tanning action. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2, 63–74. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(00\)00029-1](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(00)00029-1)
- Bosatta, E., Agren, G.I., 1991. Dynamics of Carbon and Nitrogen in the Organic Matter of the Soil: A Generic Theory. *Am. Nat.* 138, 227–245.
- Bragazza, L., Bardgett, R.D., Mitchell, E.A.D., Buttler, A., 2015. Linking soil microbial communities to vascular plant abundance along a climate gradient. *New Phytol.* 205, 1175–1182.
<https://doi.org/10.1111/nph.13116>
- Bragazza, L., Parisod, J., Buttler, A., Bardgett, R.D., 2013. Biogeochemical plant–soil microbe feedback in response to climate warming in peatlands. *Nat. Clim. Change* 3, 273–277.
<https://doi.org/10.1038/nclimate1781>
- Bragazza, L., Siffi, C., Iacumin, P., Gerdol, R., 2007. Mass loss and nutrient release during litter decay in peatland: The role of microbial adaptability to litter chemistry. *Soil Biol. Biochem.* 39, 257–267.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.07.014>
- Bragg, O.M., 2002. Hydrology of peat-forming wetlands in Scotland. *Sci. Total Environ.* 294, 111–129.
[https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00059-1](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00059-1)
- Bredon, M., Dittmer, J., Noël, C., Moumen, B., Bouchon, D., 2018. Lignocellulose degradation at the holobiont level: teamwork in a keystone soil invertebrate. *Microbiome* 6, 162.
<https://doi.org/10.1186/s40168-018-0536-y>
- Breton, C., Šnajdrová, L., Jeanneau, C., Koča, J., Imberty, A., 2006. Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology* 16, 29R–37R. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwj016>
- Bridgham, S.D., Richardson, C.J., 2002. Endogenous versus exogenous nutrient control over decomposition and mineralization in North Carolina peatlands 28.
- Brookes, P.C., 1995. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biol. Fertil. Soils* 19, 269–279. <https://doi.org/10.1007/BF00336094>
- Brown, C.T., Hug, L.A., Thomas, B.C., Sharon, I., Castelle, C.J., Singh, A., Wilkins, M.J., Wrighton, K.C., Williams, K.H., Banfield, J.F., 2015. Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria 18.
- Buchfink, B., Xie, C., Huson, D.H., 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat. Methods* 12, 59–60. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>
- Busk, P.K., Pilgaard, B., Lezyk, M.J., Meyer, A.S., Lange, L., 2017. Homology to peptide pattern for annotation of carbohydrate-active enzymes and prediction of function 9.
- Cadillo-Quiroz, H., Brauer, S., Yashiro, E., Sun, C., Yavitt, J., Zinder, S., 2006. Vertical profiles of methanogenesis and methanogens in two contrasting acidic peatlands in central New York State, USA. *Environ. Microbiol.* 8, 1428–1440. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01036.x>
- Casanueva, A., Galada, N., Baker, G.C., Grant, W.D., Heaphy, S., Jones, B., Yanhe, M., Ventosa, A., Blamey, J., Cowan, D.A., 2008. Nanoarchaeal 16S rRNA gene sequences are widely dispersed in hyperthermophilic and mesophilic halophilic environments. *Extremophiles* 12, 651–656.
<https://doi.org/10.1007/s00792-008-0170-x>



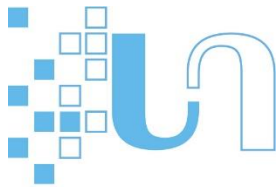
- Castelle, C.J., Banfield, J.F., 2018. Major New Microbial Groups Expand Diversity and Alter our Understanding of the Tree of Life. *Cell* 172, 1181–1197. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.016>
- Chaumeil, P.-A., Mussig, A.J., Hugenholtz, P., Parks, D.H., 2019. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. *Bioinformatics* btz848. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz848>
- Chroňáková, A., Bárta, J., Kaštovská, E., Urbanová, Z., Pícek, T., 2019. Spatial heterogeneity of belowground microbial communities linked to peatland microhabitats with different plant dominants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 95, fiz130. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz130>
- Clymo, R.S., Bryant, C.L., 2008. Diffusion and mass flow of dissolved carbon dioxide, methane, and dissolved organic carbon in a 7-m deep raised peat bog. *Geochim. Cosmochim. Acta* 72, 2048–2066. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2008.01.032>
- Clymo, R.S., Turunen, J., Tolonen, K., 1998. Carbon Accumulation in Peatland. *Oikos* 81, 368. <https://doi.org/10.2307/3547057>
- Cobucci-Ponzano, B., Conte, F., Strazzulli, A., Capasso, C., Fiume, I., Pocsfalvi, G., Rossi, M., Moracci, M., 2010. The molecular characterization of a novel GH38 α -mannosidase from the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* revealed its ability in de-mannosylating glycoproteins 13.
- Colwell, Robert.K., Lees, D.C., 2000. The mid-domain effect: geometric constraints on the geography of species richness. *Trends Ecol. Evol.* 15, 70–76. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(99\)01767-X](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(99)01767-X)
- Craft, C., 2016. Peatlands, in: *Creating and Restoring Wetlands*. Elsevier, pp. 161–192. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407232-9.00007-5>
- Cubizolle, H., & Thébaud, G. (2014). A geographical model for the altitudinal zonation of mire types in the uplands of western Europe: the example of Les Monts du Forez in eastern France. *Mires & Peat*, 15.
- Deng, M., Jiang, R., Sun, F., Zhang, X. (Eds.), 2013. *Research in Computational Molecular Biology: 17th Annual International Conference, RECOMB 2013, Beijing, China, April 7-10, 2013. Proceedings, Lecture Notes in Computer Science*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-37195-0>
- Deng, Y., Cui, X., Hernández, M., Dumont, M.G., 2014. Microbial Diversity in Hummock and Hollow Soils of Three Wetlands on the Qinghai-Tibetan Plateau Revealed by 16S rRNA Pyrosequencing. *PLoS ONE* 9, e103115. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103115>
- DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., Andersen, G.L., 2006. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5069–5072. <https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05>
- Diamond, S., Andeer, P.F., Li, Z., Crits-Christoph, A., Burstein, D., Anantharaman, K., R. Lane, K., Thomas, B.C., Pan, C., Northen, T.R., Banfield, J.F., 2019. Mediterranean grassland soil C–N compound turnover is dependent on rainfall and depth, and is mediated by genomically divergent microorganisms. *Nat. Microbiol.* 4, 16.
- DMA –Departament de Medi Ambient, Ministeri d'Agricultura i Medi Ambient, Govern d'Andorra (2005). *Inventari i estudi de les molles i patamolls d'Andorra, quarta fase*.
- Dufresne, A., Salanoubat, M., Partensky, F., Artiguenave, F., Axmann, I.M., Barbe, V., Duprat, S., Galperin, M.Y., Koonin, E.V., Le Gall, F., Makarova, K.S., Ostrowski, M., Oztas, S., Robert, C., Rogozin, I.B., Scanlan, D.J., de Marsac, N.T., Weissenbach, J., Wincker, P., Wolf, Y.I., Hess, W.R., 2003. Genome sequence of the cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* SS120, a nearly



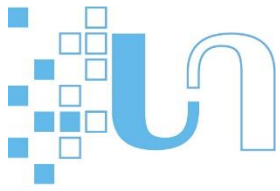
- minimal oxyphototrophic genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 10020–10025.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1733211100>
- Eddy, S.R., 1998. Profile hidden Markov models. *Bioinformatics* 14, 755–763.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/14.9.755>
- Eichorst, S.A., Breznak, J.A., Schmidt, T.M., 2007. Isolation and Characterization of Soil Bacteria That Define *Terriglobus* gen. nov., in the Phylum Acidobacteria. *APPL Env. MICROBIOL* 73, 10.
- Eichorst, S.A., Trojan, D., Roux, S., Herbold, C., Rattei, T., Woebken, D., 2018. Genomic insights into the *Acidobacteria* reveal strategies for their success in terrestrial environments: Genomic insights into acidobacteria. *Environ. Microbiol.* 20, 1041–1063. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14043>
- Eloe-Fadrosh, E.A., 2016. Metagenomics uncovers gaps in amplicon-based detection of microbial diversity. *Nat. Microbiol.* 1, 4.
- Emerson, J.B., Roux, S., Brum, J.R., Bolduc, B., Woodcroft, B.J., Jang, H.B., Singleton, C.M., Solden, L.M., Naas, A.E., Boyd, J.A., Hodgkins, S.B., Wilson, R.M., Trubl, G., Li, C., Frolking, S., Pope, P.B., Wrighton, K.C., Crill, P.M., Chanton, J.P., Saleska, S.R., Tyson, G.W., Rich, V.I., Sullivan, M.B., 2018. Host-linked soil viral ecology along a permafrost thaw gradient. *Nat. Microbiol.* 3, 870–880.
<https://doi.org/10.1038/s41564-018-0190-y>
- Enrico, M., Roux, G.L., Maruszczak, N., Heimbürger, L.-E., Claustres, A., Fu, X., Sun, R., Sonke, J.E., 2016. Atmospheric Mercury Transfer to Peat Bogs Dominated by Gaseous Elemental Mercury Dry Deposition. *Environ. Sci. Technol.* 50, 2405–2412. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b06058>
- Essington, M.E., 2004. Soil and water chemistry: an integrative approach. CRC Press, Boca Raton.
- Evans, P.N., Boyd, J.A., Leu, A.O., Woodcroft, B.J., Parks, D.H., Hugenholtz, P., Tyson, G.W., 2019. An evolving view of methane metabolism in the Archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 219–232.
<https://doi.org/10.1038/s41579-018-0136-7>
- Fenchel, T., 2017. Microorganisms (Microbes), Role of ☆, in: Reference Module in Life Sciences. Elsevier, p. B9780128096338022000. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.02277-9>
- Fenner, N., Freeman, C., 2011. Drought-induced carbon loss in peatlands. *Nat. Geosci.* 4, 895–900.
<https://doi.org/10.1038/ngeo1323>
- Fenner, N., Freeman, C., Lock, M.A., Harmens, H., Reynolds, B., Sparks, T., 2007. Interactions between Elevated CO₂ and Warming Could Amplify DOC Exports from Peatland Catchments. *Environ. Sci. Technol.* 41, 3146–3152. <https://doi.org/10.1021/es061765v>
- Fierer, N., 2017. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 579–590. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.87>
- Finn, D.R., Ziv-El, M., van Haren, J., Park, J.G., del Aguila-Pasquel, J., Urquiza-Muñoz, J.D., Cadillo-Quiroz, H., 2020. Methanogens and Methanotrophs Show Nutrient-Dependent Community Assemblage Patterns Across Tropical Peatlands of the Pastaza-Marañón Basin, Peruvian Amazonia. *Front. Microbiol.* 11, 746. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00746>
- Freeman, C., Ostle, N., Kang, H., 2001. An enzymic “latch” on a global carbon store. *Nature* 409, 149–149. <https://doi.org/10.1038/35051650>
- Frolking, S., Roulet, N.T., Moore, T.R., Richard, P.J.H., Lavoie, M., Muller, S.D., 2001. Modeling Northern Peatland Decomposition and Peat Accumulation. *Ecosystems* 4, 479–498.
<https://doi.org/10.1007/s10021-001-0105-1>
- Giannone, R.J., Huber, H., Karpinets, T., Heimerl, T., Keller, M., Hettich, R.L., Podar, M., 2011. Proteomic Characterization of Cellular and Molecular Processes that Enable the Nanoarchaeum equitans-Ignicoccus hospitalis Relationship. *PLoS ONE* 6, 19.



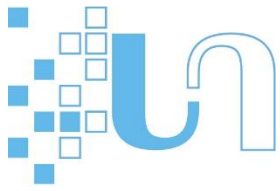
- Giovannoni, S.J., Cameron Thrash, J., Temperton, B., 2014. Implications of streamlining theory for microbial ecology. *ISME J.* 8, 1553–1565. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.60>
- Gobat, J.M., Aragno, M., Matthey, W., 1998. *Le sol vivant. Bases de pédologie et de biologie des sols.* Presses Polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, Suisse, ISBN: 2-88074-367-2
- Golovchenko, A.V., Tikhonova, E.Y., Zvyagintsev, D.G., 2007. Abundance, biomass, structure, and activity of the microbial complexes of minerotrophic and ombrotrophic peatlands 76, 8.
- Gorham, E., 1991. Northern Peatlands: Role in the Carbon Cycle and Probable Responses to Climatic Warming. *Ecol. Appl.* 1, 182–195. <https://doi.org/10.2307/1941811>
- Grote, J., Thrash, J.C., Huggett, M.J., Landry, Z.C., Carini, P., Giovannoni, S.J., Rappé, M.S., 2012. Streamlining and Core Genome Conservation among Highly Divergent Members of the SAR11 Clade. *Comp. Genomics* 3, 13.
- Gruber, M., 1981. Espèces indicatrices des différents étages de végétation dans les Pyrénées. *Bull. Société Bot. Fr. Lett. Bot.* 128, 295–302. <https://doi.org/10.1080/01811797.1981.10824515>
- Guggenberger, G., Zech, W., 1992. Dissolved organic carbon control in acid forest soils of the Fichtelgebirge (Germany) as revealed by distribution patterns and structural composition analyses 21.
- Günther, A., Barthelmes, A., Huth, V., Joosten, H., Jurasinski, G., Koebisch, F., Couwenberg, J., 2020. Prompt rewetting of drained peatlands reduces climate warming despite methane emissions. *Nat. Commun.* 11, 1644. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15499-z>
- Habekost, M., Eisenhauer, N., Scheu, S., Steinbeiss, S., Weigelt, A., Gleixner, G., 2008. Seasonal changes in the soil microbial community in a grassland plant diversity gradient four years after establishment. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2588–2595. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.06.019>
- Hamerly, T., Tripet, B.P., Tigges, M., Giannone, R.J., Hettich, R.L., Podar, M., Copié, V., Bothner, B., 2016. Untargeted metabolomics studies employing NMR and LC-MS reveal metabolic coupling between *Nanoarchaeum equitans* and its archaeal host *Ignicoccus hospitalis* 24.
- Hansson, S.V., Claustres, A., Probst, A., De Vleeschouwer, F., Baron, S., Galop, D., Mazier, F., Le Roux, G., 2017. Atmospheric and terrigenous metal accumulation over 3000 years in a French mountain catchment: Local vs distal influences. *Anthropocene* 19, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.ancene.2017.09.002>
- Hedges, J.I., Oades, J.M., 1997. Comparative organic geochemistries of soils and marine sediments. *Org. Geochem.* 27, 319–361. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(97\)00056-9](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(97)00056-9)
- Heimerl, T., Flechsler, J., Pickl, C., Heinz, V., Salecker, B., Zweck, J., Wanner, G., Geimer, S., Samson, R.Y., Bell, S.D., Huber, H., Wirth, R., Wurch, L., Podar, M., Rachel, R., 2017. A Complex Endomembrane System in the Archaeon *Ignicoccus hospitalis* Tapped by *Nanoarchaeum equitans*. *Front. Microbiol.* 8, 13.
- Hendershot, J.N., Read, Q.D., Henning, J.A., Sanders, N.J., Classen, A.T., 2017. Consistently inconsistent drivers of microbial diversity and abundance at macroecological scales. *Ecology* 98, 1757–1763. <https://doi.org/10.1002/ecy.1829>
- Hohn, M.J., Hedlund, B.P., Huber, H., 2002. Detection of 16S rDNA Sequences Representing the Novel Phylum “Nanoarchaeota”: Indication for a Wide Distribution in High Temperature Biomes. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 551–554. <https://doi.org/10.1078/07232020260517698>
- Howe, A., Yang, F., Williams, R.J., Meyer, F., Hofmockel, K.S., 2016. Identification of the Core Set of Carbon-Associated Genes in a Bioenergy Grassland Soil. *PLOS ONE* 11, e0166578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166578>



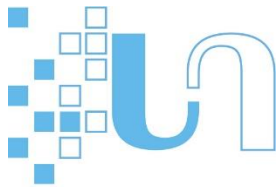
- Hu, W., Zhang, Q., Tian, T., Li, D., Cheng, G., Mu, J., Wu, Q., Niu, F., Stegen, J.C., An, L., Feng, H., 2015. Relative Roles of Deterministic and Stochastic Processes in Driving the Vertical Distribution of Bacterial Communities in a Permafrost Core from the Qinghai-Tibet Plateau, China. *PLOS ONE* 10, e0145747. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145747>
- Huber, H., Hohn, M.J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V.C., Stetter, K.O., 2002. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 417, 63–67. <https://doi.org/10.1038/417063a>
- Inskeep, W.P., McDermott, T.R., 2013. Yellowstone Lake Nanoarchaeota. *Front. Microbiol.* 8.
- Ivanova, A.A., Beletsky, A.V., Rakitin, A.L., Kadnikov, V.V., Philippov, D.A., Mardanov, A.V., Ravin, N.V., Dedysh, S.N., 2020. Closely Located but Totally Distinct: Highly Contrasting Prokaryotic Diversity Patterns in Raised Bogs and Eutrophic Fens. *Microorganisms* 8, 484. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040484>
- Jaatinen, K., Fritze, H., Laine, J., Laiho, R., 2007. Effects of short- and long-term water-level drawdown on the populations and activity of aerobic decomposers in a boreal peatland. *Glob. Change Biol.* 20.
- Jalut, G., Delibrias, G., Dagnac, J., Mardones, M., 1982. A PALAEOECOLOGICAL APPROACH TO THE LAST 21 000 YEARS IN THE PYRENEES: THE PEAT BOG OF FREYCHINEDE (ALT. 1350 m, ARIEGE, SOUTH FRANCE) 33.
- Jansson, J.K., Taş, N., 2014. The microbial ecology of permafrost. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 414–425. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3262>
- Jarett, J.K., Nayfach, S., Podar, M., Inskeep, W., Ivanova, N.N., Munson-McGee, J., Schulz, F., Young, M., Jay, Z.J., Beam, J.P., Kyrpides, N.C., Malmstrom, R.R., Stepanauskas, R., Woyke, T., 2018. Single-cell genomics of co-sorted Nanoarchaeota suggests novel putative host associations and diversification of proteins involved in symbiosis. *Microbiome* 6, 161. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0539-8>
- Jassey, V., 2013. Impact d'un réchauffement climatique sur le fonctionnement de la sphagnosphère : relations polyphenols-communautés microbiennes 241.
- Jassey, V.E., Chiapusio, G., Binet, P., Buttler, A., Laggoun-Défarge, F., Delarue, F., Bernard, N., Mitchell, E.A., Toussaint, M.-L., Francez, A.-J., Gilbert, D., 2013. Above- and belowground linkages in *Sphagnum* peatland: climate warming affects plant-microbial interactions. *Glob. Change Biol.* 19, 811–823. <https://doi.org/10.1111/gcb.12075>
- Jassey, V.E.J., Reczuga, M.K., Zielińska, M., Słowińska, S., Mariotte, P., Seppey, C.V.W., Lara, E., Barabach, J., Bragazza, L., Chojnicki, B.H., Lamentowicz, M., Buttler, A., 2018. Tipping point effect in plant-fungal interactions under severe drought causes abrupt rise in peatland ecosystem respiration 40.
- Joosten, H., Clarke, D., 2002. Wise use of mires and peatlands: background and principles including a framework for decision-making. International Peat Society ; International Mire Conservation Group, Jyväskylä] : [Greifswald.
- Juan-Ovejero, R., Briones, M.J.I., Öpik, M., 2020. Fungal diversity in peatlands and its contribution to carbon cycling. *Appl. Soil Ecol.* 146, 103393. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103393>
- Juottonen, H., Galand, P.E., Tuittila, E.-S., Laine, J., Fritze, H., Yrjala, K., 2005. Methanogen communities and Bacteria along an ecohydrological gradient in a northern raised bog complex. *Environ. Microbiol.* 7, 1547–1557. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00838.x>



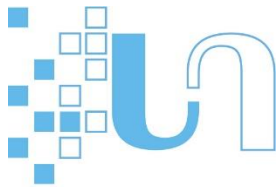
- Kaiser, K., Guggenberger, G., Haumaier, L., Zech, W., 2001. Seasonal variations in the chemical composition of dissolved organic matter in organic forest floor layer leachates of old-growth Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and European beech (*Fagus sylvatica* L.) stands in northeastern Bavaria, Germany 42.
- Kang, D.D., Li, F., Kirton, E., Thomas, A., Egan, R., An, H., Wang, Z., 2019. MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies. *PeerJ* 7, e7359. <https://doi.org/10.7717/peerj.7359>
- Kang, H., Kwon, M.J., Kim, S., Lee, S., Jones, T.G., Johncock, A.C., Haraguchi, A., Freeman, C., 2018. Biologically driven DOC release from peatlands during recovery from acidification. *Nat. Commun.* 9, 3807. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06259-1>
- Keenleyside, W.J., Clarke, A.J., Whitfield, C., 2001. Identification of Residues Involved in Catalytic Activity of the Inverting Glycosyl Transferase WbbE from *Salmonella enterica* Serovar Borreze. *J. Bacteriol.* 183, 77–85. <https://doi.org/10.1128/JB.183.1.77-85.2001>
- Kielak, A.M., Barreto, C.C., Kowalchuk, G.A., van Veen, J.A., Kuramae, E.E., 2016. The Ecology of Acidobacteria: Moving beyond Genes and Genomes. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00744>
- Krohn, J., Lozanovska, I., Kuzyakov, Y., Parvin, S., Dorodnikov, M., 2017. CH₄ and CO₂ production below two contrasting peatland micro-relief forms: An inhibitor and $\delta^{13}\text{C}$ study. *Sci. Total Environ.* 586, 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.192>
- Le Roux, G., Hansson, S.V., Claustres, A., Binet, S., Vleeschouwer, F., Gandois, L., Mazier, F., Simonneau, A., Teisserenc, R., Allen, D., Rosset, T., Haver, M., Ros, L., Galop, D., Durantez, P., Probst, A., Sánchez-Pérez, J.M., Sauvage, S., Laffaille, P., Jean, S., Schmeller, D.S., Camarero, L., Marquer, L., Lofts, S., 2020. Trace Metal Legacy in Mountain Environments: A View from the Pyrenees Mountains, in: Dontsova, K., Balogh-Brunstad, Z., Le Roux, G. (Eds.), *Geophysical Monograph Series*. Wiley, pp. 191–206. <https://doi.org/10.1002/9781119413332.ch9>
- Lehmann, J., Kleber, M., 2015. The contentious nature of soil organic matter. *Nature* 528, 60–68. <https://doi.org/10.1038/nature16069>
- Leifeld, J., Menichetti, L., 2018. The underappreciated potential of peatlands in global climate change mitigation strategies. *Nat. Commun.* 9, 1071. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03406-6>
- Leifeld, J., Wüst-Galley, C., Page, S., 2019. Intact and managed peatland soils as a source and sink of GHGs from 1850 to 2100. *Nat. Clim. Change* 9, 945–947. <https://doi.org/10.1038/s41558-019-0615-5>
- Limpens, J., Berendse, F., Blodau, C., Canadell, J.G., Freeman, C., Holden, J., Roulet, N., Rydin, H., Schaepman-Strub, G., 2008. Peatlands and the carbon cycle: from local processes to global implications – a synthesis 17.
- Lin, X., Green, S., Tfaily, M.M., Prakash, O., Konstantinidis, K.T., Corbett, J.E., Chanton, J.P., Cooper, W.T., Kostka, J.E., 2012. Microbial Community Structure and Activity Linked to Contrasting Biogeochemical Gradients in Bog and Fen Environments of the Glacial Lake Agassiz Peatland. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7023–7031. <https://doi.org/10.1128/AEM.01750-12>
- Lin, X., Tfaily, M.M., Steinweg, J.M., Chanton, P., Esson, K., Yang, Z.K., Chanton, J.P., Cooper, W., Schadt, C.W., Kostka, J.E., 2014. Microbial Community Stratification Linked to Utilization of Carbohydrates and Phosphorus Limitation in a Boreal Peatland at Marcell Experimental Forest, Minnesota, USA. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 3518–3530. <https://doi.org/10.1128/AEM.00205-14>



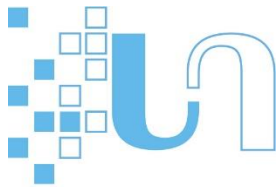
- Lipson, D.A., Schmidt, S.K., 2004. Seasonal Changes in an Alpine Soil Bacterial Community in the Colorado Rocky Mountains. *APPL Env. MICROBIOL* 70, 13.
- López-Mondéjar, R., Zühlke, D., Becher, D., Riedel, K., Baldrian, P., 2016. Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems. *Sci. Rep.* 6, 25279. <https://doi.org/10.1038/srep25279>
- López-Pérez, M., Gonzaga, A., Martín-Cuadrado, A.-B., López-García, P., Rodríguez-Valera, F., Kimes, N.E., 2013. Intra- and Intergenomic Variation of Ribosomal RNA Operons in Concurrent *Alteromonas macleodii* Strains. *Microb. Ecol.* 65, 720–730. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0153-4>
- Luo, X., Wang, M.K., Hu, G., Weng, B., 2019. Seasonal Change in Microbial Diversity and Its Relationship with Soil Chemical Properties in an Orchard. *PLOS ONE* 14, e0215556. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215556>
- Maidak, B.L., 2000. The RDP (Ribosomal Database Project) continues. *Nucleic Acids Res.* 28, 173–174. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.173>
- Manneville O, Vergne V, Villepoux O, Groupe Relais Tourbières (1999) Le monde des tourbières et des marais, France, Suisse, Belgique et Luxembourg. In: Delachaux & Nestlé S.A. - Paris, Lausanne. 320p.
- Mardanov, A.V., Gumerov, V.M., Beletsky, A.V., Ravin, N.V., 2018. Microbial diversity in acidic thermal pools in the Uzon Caldera, Kamchatka. *Antonie Van Leeuwenhoek* 111, 35–43. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0924-5>
- Martijn, J., Schön, M.E., Lind, A.E., Vosseberg, J., Williams, T.A., Spang, A., Ettema, T.J.G., 2020. Hikarchaea demonstrate an intermediate stage in the methanogen-to-halophile transition. *Nat. Commun.* 11, 5490. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19200-2>
- Martini, I.P., Martínez Cortizas, A., Chesworth, W., 2006. Peatlands - Evolution and Records of Environmental and Climate Changes, Developments in Earth Surface Processes. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0928-2025\(06\)X0900-8](https://doi.org/10.1016/S0928-2025(06)X0900-8)
- Maslov, M.N., Maslova, O.A., 2020. Temperate peatlands use-management effects on seasonal patterns of soil microbial activity and nitrogen availability 9.
- McCalley, C.K., Woodcroft, B.J., Hodgkins, S.B., Wehr, R.A., Kim, E.-H., Mondav, R., Crill, P.M., Chanton, J.P., Rich, V.I., Tyson, G.W., Saleska, S.R., 2014. Methane dynamics regulated by microbial community response to permafrost thaw. *Nature* 514, 478–481. <https://doi.org/10.1038/nature13798>
- McCliment, E.A., Voglesonger, K.M., O'Day, P.A., Dunn, E.E., Holloway, J.R., Cary, S.C., 2006. Colonization of nascent, deep-sea hydrothermal vents by a novel Archaeal and Nanoarchaeal assemblage. *Environ. Microbiol.* 8, 114–125. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00874.x>
- Megonigal, J.P., Hines, M.E., Visscher, P.T., 2004. 8.08 Anaerobic Metabolism: Linkages to Trace Gases and Aerobic Processes 108.
- Mellegård, H., Stalheim, T., Hormazabal, V., Granum, P.E., Hardy, S.P., 2009. Antibacterial activity of sphagnum acid and other phenolic compounds found in *Sphagnum papillosum* against food-borne bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 85–90. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02622.x>
- Mensitieri, F., De Lise, F., Strazzulli, A., Moracci, M., Notomista, E., Cafaro, V., Bedini, E., Sazinsky, M.H., Trifuoggi, M., Di Donato, A., Izzo, V., 2018. Structural and functional insights into RHA-P, a



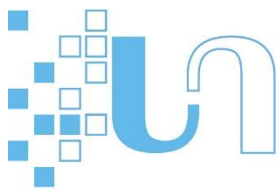
- bacterial GH106 α -L-rhamnosidase from *Novosphingobium* sp. PP1Y. *Arch. Biochem. Biophys.* 11.
- Minasny, B., Berglund, Ö., Connolly, J., Hedley, C., de Vries, F., Gimona, A., Kempen, B., Kidd, D., Lilja, H., Malone, B., McBratney, A., Roudier, P., O'Rourke, S., Rudiyanto, Padarian, J., Poggio, L., ten Caten, A., Thompson, D., Tuve, C., Widyatmanti, W., 2019. Digital mapping of peatlands – A critical review. *Earth-Sci. Rev.* 196, 102870. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2019.05.014>
- Mondav, R., McCalley, C.K., Hodgkins, S.B., Frolking, S., Saleska, S.R., Rich, V.I., Chanton, J.P., Crill, P.M., 2017. Microbial network, phylogenetic diversity and community membership in the active layer across a permafrost thaw gradient. *Environ. Microbiol.* 19, 3201–3218. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13809>
- Mondav, R., Woodcroft, B.J., Kim, E.-H., McCalley, C.K., Hodgkins, S.B., Crill, P.M., Chanton, J., Hurst, G.B., VerBerkmoes, N.C., Saleska, S.R., Hugenholtz, P., Rich, V.I., Tyson, G.W., 2014. Discovery of a novel methanogen prevalent in thawing permafrost. *Nat. Commun.* 5, 3212. <https://doi.org/10.1038/ncomms4212>
- Monna, F., Galop, D., Carozza, L., Tual, M., Beyrie, A., Marembert, F., Chateau, C., Dominik, J., Grousset, F.E., 2004. Environmental impact of early Basque mining and smelting recorded in a high ash minerogenic peat deposit. *Sci. Total Environ.* 327, 197–214. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.01.010>
- Moore, E.K., Villanueva, L., Hopmans, E.C., Rijpstra, W.I.C., Mets, A., Dedysh, S.N., Sinninghe Damsté, J.S., 2015. Abundant Trimethylornithine Lipids and Specific Gene Sequences Are Indicative of Planctomycete Importance at the Oxic/Anoxic Interface in Sphagnum-Dominated Northern Wetlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 6333–6344. <https://doi.org/10.1128/AEM.00324-15>
- Moore, P.A., Lukenbach, M.C., Thompson, D.K., Kettridge, N., Granath, G., Waddington, J.M., 2019. Assessing the peatland hummock–hollow classification framework using high-resolution elevation models: implications for appropriate complexity ecosystem modeling. *Biogeosciences* 16, 3491–3506. <https://doi.org/10.5194/bg-16-3491-2019>
- Moore, P.D., 2002. The future of cool temperate bogs. *Environ. Conserv.* 29, 3–20. <https://doi.org/10.1017/S0376892902000024>
- Müller, O., Bang-Andreasen, T., White, R.A., Elberling, B., Taş, N., Kneafsey, T., Jansson, J.K., Øvreås, L., 2018. Disentangling the complexity of permafrost soil by using high resolution profiling of microbial community composition, key functions and respiration rates. *Environ. Microbiol.* 20, 4328–4342. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14348>
- Munson-McGee, J.H., Field, E.K., Bateson, M., Rooney, C., Stepanauskas, R., Young, M.J., 2015. Nanoarchaeota, Their Sulfolobales Host, and Nanoarchaeota Virus Distribution across Yellowstone National Park Hot Springs. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 7860–7868. <https://doi.org/10.1128/AEM.01539-15>
- Myhre, G., Shindell, D., Bréon, F.-M., Collins, W., Fuglestedt, J., Huang, J., Koch, D., Lamarque, J.-F., Lee, D., Mendoza, B., Nakajima, T., Robock, A., Stephens, G., Zhang, H., Aamaas, B., Boucher, O., Dalsøren, S.B., Daniel, J.S., Forster, P., Granier, C., Haigh, J., Hodnebrog, Ø., Kaplan, J.O., Marston, G., Nielsen, C.J., O'Neill, B.C., Peters, G.P., Pongratz, J., Ramaswamy, V., Roth, R., Rotstayn, L., Smith, S.J., Stevenson, D., Vernier, J.-P., Wild, O., Young, P., Jacob, D., Ravishankara, A.R., Shine, K., n.d. 8 Anthropogenic and Natural Radiative Forcing 82.
- Nawrocki, E.P., 2009. STRUCTURAL RNA HOMOLOGY SEARCH AND ALIGNMENT USING COVARIANCE MODELS 281.



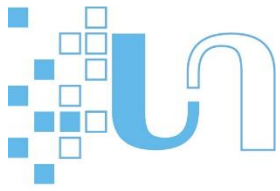
- Nichols, J.E., Peteet, D.M., 2019. Rapid expansion of northern peatlands and doubled estimate of carbon storage. *Nat. Geosci.* 12, 917–921. <https://doi.org/10.1038/s41561-019-0454-z>
- Page, S.E., Baird, A.J., 2016. Peatlands and Global Change: Response and Resilience. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 41, 35–57. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-110615-085520>
- Pankratov, T.A., Dedysh, S.N., 2010. *Granulicella paludicola* gen. nov., sp. nov., *Granulicella pectinivorans* sp. nov., *Granulicella aggregans* sp. nov. and *Granulicella rosea* sp. nov., acidophilic, polymer-degrading acidobacteria from Sphagnum peat bogs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 2951–2959. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.021824-0>
- Pankratov, T.A., Ivanova, A.O., Dedysh, S.N., Liesack, W., 2011. Bacterial populations and environmental factors controlling cellulose degradation in an acidic Sphagnum peat: Cellulose degradation in acidic peat. *Environ. Microbiol.* 13, 1800–1814. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02491.x>
- Parks, D.H., Imelfort, M., Skennerton, C.T., Hugenholtz, P., Tyson, G.W., 2015. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res.* 25, 1043–1055. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
- Parks, D.H., Rinke, C., Chuvochina, M., Chaumeil, P.-A., Woodcroft, B.J., Evans, P.N., Hugenholtz, P., Tyson, G.W., 2017. Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life. *Nat. Microbiol.* 2, 1533–1542. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0012-7>
- Peng, Y., Leung, H.C.M., Yiu, S.M., Chin, F.Y.L., 2012. IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics* 28, 1420–1428. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts174>
- Piccolo, A. (Ed.), 1996. *Humic substances in terrestrial ecosystems*. Elsevier, New York.
- Podar, M., Makarova, K.S., Graham, D.E., Wolf, Y.I., Koonin, E.V., Reysenbach, A.-L., 2013. Insights into archaeal evolution and symbiosis from the genomes of a nanoarchaeon and its inferred crenarchaeal host from Obsidian Pool, Yellowstone National Park. *Biol. Direct* 8, 9. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-8-9>
- Ponnamperuma, F. N., 1972. The chemistry of submerged soils. *Advan. Agron.* 24, 29–96.
- Praeg, N., Pauli, H., Illmer, P., 2019. Microbial Diversity in Bulk and Rhizosphere Soil of *Ranunculus glacialis* Along a High-Alpine Altitudinal Gradient. *Front. Microbiol.* 10, 1429. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01429>
- Preston, M.D., Smemo, K.A., McLaughlin, J.W., Basiliko, N., 2012. Peatland Microbial Communities and Decomposition Processes in the James Bay Lowlands, Canada. *Front. Microbiol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00070>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Rasmussen, S., Wolff, C., Rudolph, H., 1995. Compartmentalization of phenolic constituents in sphagnum. *Phytochemistry* 38, 35–39. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00650-l](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00650-l)
- Reille, M., 1990. Recherches pollenanalytiques dans l'extrémité orientale des Pyrénées : données nouvelles, de la fin du Glaciaire à l'Actuel. *Ecol. Mediterr.* 16, 317–357. <https://doi.org/10.3406/ecmed.1990.1673>
- Rice, A.V., Tsuneda, A., Currah, R.S., 2006. In vitro decomposition of Sphagnum by some microfungi resembles white rot of wood. *FEMS Microbiol Ecol* 11.
- Rice, P., 2000. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite 2.



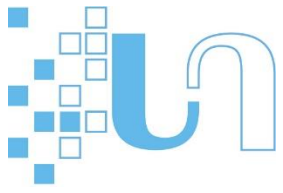
- Robroek, B.J.M., Heijboer, A., Jassey, V.E.J., Hefting, M.M., Rouwenhorst, T.G., Buttler, A., Bragazza, L., 2013. Snow cover manipulation effects on microbial community structure and soil chemistry in a mountain bog. *Plant Soil* 14.
- Rocap, G., Larimer, F.W., Lamerdin, J., Malfatti, S., Chain, P., Ahlgren, N.A., Arellano, A., Coleman, M., Hauser, L., Hess, W.R., Johnson, Z.I., Land, M., Lindell, D., Post, A.F., Regala, W., Shah, M., Shaw, S.L., Steglich, C., Sullivan, M.B., Ting, C.S., Tolonen, A., Webb, E.A., Zinser, E.R., Chisholm, S.W., 2003. Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation 424, 6.
- Rosset, T., Binet, S., Antoine, J.-M., Lerigoleur, E., Rigal, F., Gandois, L., 2020. Drivers of seasonal and event scale DOC dynamics at the outlet of mountainous peatlands revealed by high frequency monitoring 33.
- Rosset, T., 2019. Transfert de carbone organique des tourbières vers les eaux de surfaces. Quantification, identification des mécanismes de contrôles et détermination de l'influence des activités anthropiques locales. Université de Toulouse ; France.
- Rouse, W. R., Douglas, M. S., Hecky, R. E., Hershey, A. E., Kling, G. W., Lesack, L., ... & Smol, J. P. (1997). Effects of climate change on the freshwaters of arctic and subarctic North America. *Hydrological processes*, 11(8), 873-902.
- Rydin, H., Jeglum, J.K., Hooijer, A., 2006. The biology of peatlands, The biology of habitats. Oxford University Press, Oxford ; New York.
- Schmidt, O., Horn, M.A., Kolb, S., Drake, H.L., 2015. Temperature impacts differentially on the methanogenic food web of cellulose-supplemented peatland soil: Differential temperature effects on peat microbes. *Environ. Microbiol.* 17, 720–734. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12507>
- Seward, J., Carson, M.A., Lamit, L.J., Basiliko, N., Yavitt, J.B., Lilleskov, E., Schadt, C.W., Smith, D.S., Mclaughlin, J., Mykytczuk, N., Willims-Johnson, S., Roulet, N., Moore, T., Harris, L., Bräuer, S., 2020. Peatland Microbial Community Composition Is Driven by a Natural Climate Gradient. *Microb. Ecol.* 80, 593–602. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01510-z>
- Singleton, C.M., McCalley, C.K., Woodcroft, B.J., Boyd, J.A., Evans, P.N., Hodgkins, S.B., Chanton, J.P., Frolking, S., Crill, P.M., Saleska, S.R., Rich, V.I., Tyson, G.W., 2018. Methanotrophy across a natural permafrost thaw environment. *ISME J.* 12, 2544–2558. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0065-5>
- Sjögersten, S., Cheesman, A.W., Lopez, O., Turner, B.L., 2011. Biogeochemical processes along a nutrient gradient in a tropical ombrotrophic peatland. *Biogeochemistry* 104, 147–163. <https://doi.org/10.1007/s10533-010-9493-7>
- Tanneberger, F., Tegetmeyer, C., Busse, S., Barthelmes, A., and 55 others, 2017. The peatland map of Europe. *Mires Peat* 1–17. <https://doi.org/10.19189/MaP.2016.OMB.264>
- Tarnocai, C., Canadell, J.G., Schuur, E.A.G., Kuhry, P., Mazhitova, G., Zimov, S., 2009. Soil organic carbon pools in the northern circumpolar permafrost region: SOIL ORGANIC CARBON POOLS. *Glob. Biogeochem. Cycles* 23, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1029/2008GB003327>
- Tasuku, I., 2014. Trends in Glycoscience and Glycotechnology 26(151): 131-140 (2014) 10.
- Thoms, C., Gleixner, G., 2013. Seasonal differences in tree species' influence on soil microbial communities. *Soil Biol.* 10.

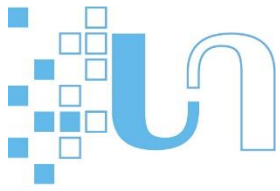


- Tian, W., Wang, H., Xiang, X., Wang, R., Xu, Y., 2019. Structural Variations of Bacterial Community Driven by Sphagnum Microhabitat Differentiation in a Subalpine Peatland. *Front. Microbiol.* 10, 1661. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01661>
- Too, C.C., Keller, A., Sickel, W., Lee, S.M., Yule, C.M., 2018. Microbial Community Structure in a Malaysian Tropical Peat Swamp Forest: The Influence of Tree Species and Depth. *Front. Microbiol.* 9, 2859. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02859>
- Torsvik, V., Øvreås, L., 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 240–245. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00324-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00324-7)
- Turunen, J., Tomppo, E., Tolonen, K., Reinikainen, A., 2002. Estimating carbon accumulation rates of undrained mires in Finland—application to boreal and subarctic regions. *The Holocene* 12, 69–80. <https://doi.org/10.1191/0959683602hl522rp>
- Tutschek, R., 1979. Characterization of a peroxidase from *Sphagnum Magellanicum*. *Phytochemistry*. 18, 1437–1439.
- Van Breemen, N., 1995. How *Sphagnum* bogs down other plants. *Tree*. 10, 270–275.
- Verhoeven, J.T.A., Liefveld, W.M., 1997. The ecological significance of organochemical compounds in *Sphagnum*. *Acta Bot. Neerlandica* 46, 117–130. <https://doi.org/10.1111/plb.1997.46.2.117>
- Verhoeven, J.T.A., Toth, E., 1995. Decomposition of *Carex* and *Sphagnum* litter in fens: Effect of litter quality and inhibition by living tissue homogenates. *Soil Biol. Biochem.* 27, 271–275. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)00183-2](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)00183-2)
- Wall, L.G., Gabbarini, L.A., Ferrari, A.E., Frene, J.P., Covelli, J., Reyna, D., Robledo, N.B., 2019. Changes of paradigms in agriculture soil microbiology and new challenges in microbial ecology. *Acta Oecologica* 95, 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2019.02.001>
- Wang, M., Tian, J., Bu, Z., Lamit, L.J., Chen, H., Zhu, Q., Peng, C., 2019. Structural and functional differentiation of the microbial community in the surface and subsurface peat of two minerotrophic fens in China. *Plant Soil* 437, 21–40. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-03962-w>
- Wardle, D.A., Walker, L.R., Bardgett, R.D., 2004. Ecosystem Properties and Forest Decline in Contrasting Long-Term Chronosequences 305, 6.
- Weiss, M., Abele, U., Weckesser, J., Welte, W., Schiltz, E., Schulz, G., 1991. Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin. *Science* 254, 1627–1630. <https://doi.org/10.1126/science.1721242>
- Whang, K.-S., Lee, J.-C., Lee, H.-R., Han, S.-I., Chung, S.-H., 2014. *Terriglobus tenax* sp. nov., an exopolysaccharide-producing acidobacterium isolated from rhizosphere soil of a medicinal plant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 431–437. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.053769-0>
- Wheeler, B.D., Proctor, M.C.F., 2000. Ecological gradients, subdivisions and terminology of north-west European mires. *J. Ecol.* 88, 187–203. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2000.00455.x>
- White, J.R., Shannon, R.D., Weltzin, J.F., Pastor, J., Bridgman, S.D., 2008. Effects of soil warming and drying on methane cycling in a northern peatland mesocosm study. *J. Geophys. Res.* 113, G00A06. <https://doi.org/10.1029/2007JG000609>
- Wilschke, J., Sprengel, B., Wolff, C., Rudolph, H., 1989. A hydroxybutenolide from sphagnum species. *Phytochemistry* 28, 1725–1727. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97833-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97833-6)
- Winsborough, C., Basiliko, N., 2010. Fungal and Bacterial Activity in Northern Peatlands. *Geomicrobiol. J.* 27, 315–320. <https://doi.org/10.1080/01490450903424432>
- Woodcroft, B.J., Singleton, C.M., Boyd, J.A., Evans, P.N., Emerson, J.B., Zayed, A.A.F., Hoelzle, R.D., Lamberton, T.O., McCalley, C.K., Hodgkins, S.B., Wilson, R.M., Purvine, S.O., Nicora, C.D., Li, C.,



- Frolking, S., Chanton, J.P., Crill, P.M., Saleska, S.R., Rich, V.I., Tyson, G.W., 2018a. Genome-centric view of carbon processing in thawing permafrost. *Nature* 560, 49–54. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0338-1>
- Wurch, L., Giannone, R.J., Belisle, B.S., Swift, C., Utturkar, S., Hettich, R.L., Reysenbach, A.-L., Podar, M., 2016. Genomics-informed isolation and characterization of a symbiotic Nanoarchaeota system from a terrestrial geothermal environment. *Nat. Commun.* 7, 12115. <https://doi.org/10.1038/ncomms12115>
- Xu, J., Morris, P.J., Liu, J., Holden, J., 2018. PEATMAP: Refining estimates of global peatland distribution based on a meta-analysis. *CATENA* 160, 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2017.09.010>
- Xu, M., Li, Xiaoliang, Cai, X., Gai, J., Li, Xiaolin, Christie, P., Zhang, J., 2014. Soil microbial community structure and activity along a montane elevational gradient on the Tibetan Plateau. *Eur. J. Soil Biol.* 64, 6–14. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.06.002>
- Yilmaz, P., Parfrey, L.W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., Glöckner, F.O., 2014. The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Res.* 42, D643–D648. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>
- Yu, Z., Loisel, J., Brosseau, D.P., Beilman, D.W., Hunt, S.J., 2010. Global peatland dynamics since the Last Glacial Maximum: GLOBAL PEATLANDS SINCE THE LGM. *Geophys. Res. Lett.* 37, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1029/2010GL043584>
- Yun, J., Ju, Y., Deng, Y., Zhang, H., 2014. Bacterial Community Structure in Two Permafrost Wetlands on the Tibetan Plateau and Sanjiang Plain, China. *Microb. Ecol.* 68, 360–369. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0415-4>
- Zhang, H., Yohe, T., Huang, L., Entwistle, S., Wu, P., Yang, Z., Busk, P.K., Xu, Y., Yin, Y., 2018. dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation 7.
- Zhong, Q., Chen, H., Liu, L., He, Y., Zhu, D., Jiang, L., Zhan, W., Hu, J., 2017. Water table drawdown shapes the depth-dependent variations in prokaryotic diversity and structure in Zoige peatlands. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix049>
- Zhou, X., Zhang, Z., Tian, L., Li, X., Tian, C., 2017. Microbial communities in peatlands along a chronosequence on the Sanjiang Plain, China. *Sci. Rep.* 7, 9567. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10436-5>





Résumé

Les microorganismes sont les principaux acteurs de la dégradation de la matière organique d'origine végétale, et influencent directement le stockage et le relargage de carbone. Dans les tourbières, l'activité microbienne est inhibée par les conditions globalement anoxiques, les pH acides et les faibles concentrations en nutriments. Par conséquent, les tourbières sont le troisième réservoir de carbone mondial après les océans et les forêts, alors que leur surface ne représente que 3% des terres émergées. Bien que de moindre ampleur que les systèmes tourbeux des hautes latitudes australes et boréales, les tourbières des étages montagnards à plus basse latitude reste moins étudiées à ce jour mais méritent, elles aussi, une grande attention. Ainsi, afin de mieux comprendre le rôle des microorganismes dans le fonctionnement de ces écosystèmes, nous avons étudié quatre tourbières localisées dans les Pyrénées. Dans une première étude, nous avons observé des patrons similaires dans la structure des communautés microbiennes sur les carottes de trois tourbières d'altitude (Andorre et Espagne), avec une diversité fortement stratifiée sur la profondeur et en lien avec le rapport massique carbone/azote, la densité apparente et la teneur en eau de la tourbe. Dans une deuxième étude réalisée sur la tourbière de Bernadouze (Ariège, France), et grâce à un échantillonnage intensif, nous avons pu mettre en évidence que la saison et les habitats (e.g. buttes, gouilles) n'avaient que peu d'influence sur la structure des communautés microbiennes. A l'inverse, le pH, la distance à la nappe et dans une moindre mesure le rapport massique carbone/azote ont été identifiés comme étant les déterminants majeurs des variations de diversité et composition des communautés microbiennes, traduisant une distribution spatiale non aléatoire des bactéries et des archées. Ces résultats ont été confirmés grâce à une approche génome-centré développée dans une troisième étude. L'assemblage de 290 génomes uniques répartis dans 27 lignées différentes, a ainsi montré que les Acidobacteria étaient des bactéries clés dans le fonctionnement de la tourbière de Bernadouze, possédant le potentiel métabolique pour dégrader la matière organique complexe. Enfin, une lignée d'archée méthanogène très abondante à pH acide a été identifiée, suggérant que la méthanogenèse pouvait être un processus important dans la tourbière de Bernadouze.

Abstract

Microorganisms are the key factors in plant litter decomposition, and directly influence the storage and release of carbon. In peatlands, microbial activity is inhibited by the concomitant anoxic, acidic, and poor nutrient conditions. As a result, peatlands store one-third of global soil carbon pool, while they occupy only 3% of the global land surface. Although smaller than boreal, austral, and subarctic peatlands, mountain peatlands located at lower latitudes are less studied but deserve also our full attention. Thus, to investigate the diversity and the role of the microorganisms in the functioning of these unique ecosystems, we collected samples from four peatlands located in the Pyrenees. In a first study, we observed similar patterns in the structure of microbial communities in three high-altitude peatlands (Andorra and Spain), with the microbial diversity being highly stratified over the depth gradient and related also to the carbon/nitrogen mass ratio, bulk density and water content. In a second study carried out at the Bernadouze peatland (Ariège, France), and thanks to an intensive sampling, we showed that the season and microhabitats (e.g. hummocks, hollows) had little influence on the structure of the microbial communities. Conversely, pH, distance to the water table and, to a lesser extent, the carbon/nitrogen mass ratio were identified as the major determinants of the variations in microbial community diversity and composition, reflecting a non-random spatial distribution of bacteria and archaea throughout the landscape. These results were confirmed by a genome-centric approach developed in a third study. The assembly of 290 unique genomes distributed in 27 different lineages showed that Acidobacteria were key bacteria in the functioning of the Bernadouze peatland, with the metabolic potential to degrade complex organic matter. Finally, a highly abundant methanogenic archaeal lineage at acidic pH was identified, suggesting that methanogenesis may be an important process in the Bernadouze bog.

ECOLE DOCTORALE :
École doctorale Sciences Exactes et leurs Applications

LABORATOIRE :
Institut des sciences analytiques et de physico-chimie pour l'environnement et les matériaux