

UNIVERSITE DE BOURGOGNE
Ecole doctorale Environnements-Santé

INRA

Unité Mixte de Recherche 1347 Agroécologie INRA/AgroSup/uB
Pôle Ecologie des communautés et durabilité des systèmes agricoles

THESE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Sciences de la Vie
Spécialité : Ecologie microbienne

par

Emilie BOURGEOIS

le 16 Décembre 2015

**Contribution au développement de bioindicateurs microbiens pour
l'évaluation de l'impact de pratiques agricoles sur les sols**

Directeur de thèse – Pierre-Alain MARON
Co-encadrant de thèse – Lionel RANJARD

Jury :

Isabelle DOMAIZON	Directeur de Recherches, INRA Thonon	Rapporteur
Christian MOUGIN	Directeur de Recherches, INRA Versailles-Grignon	Rapporteur
Loïc BOLLACHE	Professeur, Université de Bourgogne, Dijon	Examineur
Raphael GROS	Maître de Conférences, Université Aix-Marseille	Examineur
Francis GARRIDO	Chercheur, BRGM, Orléans	Examineur
Antonio BISPO	Ingénieur, ADEME, Angers	Examineur
Pierre-Alain MARON	Chargé de Recherches, INRA Dijon	Directeur de thèse
Lionel RANJARD	Directeur de Recherches, INRA Dijon	Co-encadrant de thèse

RESUME

Le sol représente le support de la production agricole. A l'interface avec les autres compartiments de la biosphère, il remplit de nombreuses fonctions essentielles à la fourniture de services écosystémiques nécessaires au bien-être de nos sociétés. C'est aussi une ressource non renouvelable dont les propriétés physicochimiques et biologiques ont été altérées par le développement de l'agriculture intensive. La prise de conscience actuelle de cet état de fait a révélé la nécessité de définir de nouveaux modes de gestion adaptés à la préservation et à l'utilisation durable des sols. Elle a ainsi marqué l'entrée dans l'ère de l'agroécologie qui prône un modèle de production optimisant notamment les services rendus par la biodiversité afin de réduire le recours aux intrants et à l'utilisation d'énergie. Pour atteindre cet objectif, le développement d'une gamme d'indicateurs permettant d'évaluer les pratiques/systèmes agricoles en rendant compte de la qualité biologique du sol est donc indispensable.

Cette thèse, dont l'objectif est de contribuer au développement de bioindicateurs microbiens de la qualité du sol, s'inscrit dans ce contexte agroécologique. Le choix de travailler sur les communautés microbiennes se justifie pleinement dans cette problématique car elles sont (i) présentes avec une forte densité et diversité dans tous les environnements, (ii) fortement impliquées dans le fonctionnement biologique et les services rendus par le sol, et (iii) elles répondent de façon très sensible aux changements des conditions environnementales en termes de modification de biomasse, de structure/diversité et d'activité. Elles offrent donc un potentiel important en termes de développement de bioindicateurs.

Ce travail a porté plus précisément sur l'évaluation de deux indicateurs complémentaires : (i) la biomasse moléculaire microbienne et (ii) la diversité taxonomique microbienne. Dans une première partie nous avons éprouvé la robustesse de ces deux indicateurs en évaluant les biais associés à chacune des étapes techniques des procédures mises en œuvre pour leur mesure. Nous avons ensuite utilisé ces deux indicateurs dans différents contextes agronomiques pour évaluer leur pertinence. Un premier travail a ainsi consisté à suivre la réhabilitation du patrimoine microbien, par l'implantation d'une culture à vocation énergétique, d'un sol pollué irrigué pendant une centaine d'années par des eaux usées. Une seconde application a porté sur l'étude de l'impact de différentes pratiques agricoles sur les communautés microbiennes selon l'intensité du travail du sol (labour vs. travail réduit), la gestion des résidus de culture (export vs. restitution), et le type de culture (annuelle vs. pérenne).

Les résultats montrent que la biomasse moléculaire microbienne et la diversité taxonomique obtenue par séquençage massif sont deux bioindicateurs robustes et sensibles pour décrire la qualité microbiologique des sols agricoles dans des contextes très variés. Ces deux indicateurs permettent de mettre en évidence aussi bien des perturbations des sols que l'impact positif de pratiques innovantes. Ils peuvent donc représenter des outils performants pour l'évaluation des systèmes agricoles, aidant à une amélioration de leur mode de gestion et, à long terme, permettant une utilisation durable des ressources fournies par ces sols.

Mots clés : agroécologie, pratiques agricoles, bioindicateurs, écologie microbienne, sol, biomasse moléculaire microbienne, diversité taxonomique, bactéries, champignons.

ABSTRACT

Soil is the support of agricultural production. It performs many functions essential to the provision of ecosystem services necessary for the well-being of our societies. Soil physicochemical and biological properties have been altered by the development of intensive agriculture while it is a non-renewable resource, revealing the need to develop new management practices suitable for the sustainability of soil quality. This also marked the entry into the “Agroecology” era, which promotes the development of new agricultural systems optimizing services provided by biodiversity to reduce the use of inputs and energy use. To achieve this aim, the development of a range of indicators to assess the impact of agricultural practices on the biological quality of the soil is essential.

This thesis, which aims to contribute to the development of microbial bio-indicators of soil quality, is a part of this agroecological context. The choice to work on microbial communities is fully justified because they are (i) present with a high abundance and diversity in all environments, (ii) heavily involved in biological functioning and the soil ecosystem services, (iii) they respond very sensitive to changes in environmental conditions in terms of biomass, diversity and activity. They therefore have significant potential in terms of bio-indicators of development.

This work has focused specifically on the evaluation of two complementary bioindicators: (i) the microbial molecular biomass and (ii) the microbial taxonomic diversity. In a first part we tested the robustness of these two bioindicators by assessing the biases associated with each of the procedure technical steps used for their measurement. We then used these bioindicators in different agricultural contexts to assess their sensitivity. A first work has followed the rehabilitation of microbial patrimony of a polluted soil irrigated for a hundred years by sewage, by implanting a bioenergy crop. A second application has focused on the impact of different agricultural practices on microbial communities depending on the intensity of tillage (tillage *vs.* reduced tillage), management of crop residues (export *vs.* restitution), and the crop type (annual *vs.* perennial).

Results highlighted that microbial molecular biomass and microbial taxonomic diversity achieved by high throughput sequencing are both robust and sensitive bioindicators to describe the microbiological quality of agricultural soils in very different contexts. Both bioindicators allow evidencing soil disturbances but also the positive impact of innovative practices. They may therefore represent powerful tools for the assessment of agricultural systems, helping to improve their long term management, allowing a sustainable use of resources provided by soils.

Keywords: agroecology, agricultural practices, bioindicators, microbial ecology, soil, microbial molecular biomass, taxonomic diversity, bacteria, fungi.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury. Merci à Madame Isabelle DOMAIZON et Monsieur Christian MOUGIN pour avoir accepté d'évaluer ce travail en tant que rapporteurs. Je remercie également les examinateurs, Messieurs Loïc BOLLACHE, Raphael GROS, Francis GARRIDO et Antonio BISPO d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.

Je remercie le Ministère de la Recherche pour le financement de ce travail ainsi que Philippe LEMANCEAU, directeur de l'UMR Agroécologie de l'INRA de Dijon, pour m'avoir accueilli dans ses locaux.

Passons maintenant aux choses sérieuses... ces trois années de thèse sont passées à une vitesse folle mais elles ont été remplies de bonheur et c'est en grande partie grâce à toutes les merveilleuses personnes que j'ai pu rencontrer ou avec qui j'ai travaillé. Je vais donc maintenant prendre le temps de leur dire un grand MERCI !!!

Commençons tout d'abord par les deux grands hommes qui m'ont permis d'avoir cette thèse, mes supers chefs Pierre-Alain Maron et Lionel Ranjard. J'ai vraiment apprécié apprendre à vos côtés. Vous avez deux manières très différentes de travailler, toi Lionel en laissant beaucoup de liberté, notamment sur la rédaction des articles, tu m'as permis de prendre plus confiance en moi-même si à chaque fois que je venais te voir j'avais droit à un « il y a tout mais pas dans le bon ordre !! ». Peut-être que j'aurais avancé plus vite si tu ne m'avais pas autant laissé ce temps d'apprentissage, de réflexion, mais en tout cas je suis ravie de ce déroulement et je t'en remercie beaucoup !! Toi Pam, tu m'as beaucoup plus encadré, tu as été plus exigeant sur ma façon d'analyser mes résultats, sur la qualité de mes figures, sur ma façon de rédiger (du rouge, et du rouge, et du rouge partout...☺) mais je ne peux également que te remercier !! J'avais aussi besoin de cette structuration et le fait que tu m'ais poussé comme tu l'as fait m'as permis de tout faire pour essayer de me dépasser à chaque fois !! Je ne vous ai probablement pas assez dit ce que j'ai ressenti pendant ces trois années alors en quelques mots : si je suis discrète c'est que j'ai horreur de décevoir les personnes que j'apprécie, c'est pour moi le pire qui puisse arriver. Du coup je me mets beaucoup de pression pour faire le mieux possible et je me déçois énormément quand je sens que je stagne ou que je suis coincée. Toutefois cette partie de moi ne m'a pas du tout empêché de profiter pleinement de ces trois années !! Je me suis vraiment éclatée, j'ai pris du plaisir au quotidien, que ce soit

pour les manip, pour les préparations de ppt, les recherches biblio ou encore la rédaction (bon sur la fin c'était quand même un peu barbant je l'avoue !!), tout m'a apporté de la satisfaction !!! Moi ce que je retiens de ces trois années, c'est que j'ai été ravie de me lever tous les matins pour venir apprendre à vos côtés alors je vous remercie vraiment pour l'encadrement que vous m'avez fourni, vos conseils, votre patience, et votre confiance !!!!

Bon passons maintenant à toutes les personnes géniales des équipes Biocom et GenoSol, passées ou toujours présentes (et oui il y en a du changement...) : Nikos, Sophie, Vivi, Mel, Walid, Gaëlle, Sam, AL, Amandine, Fabiola, Pascal, Céline, Seb, Pierrot, Flo (Florentin), Vince, Kanto, Flo (Florence), Juju, Tiff, Lulu, Fafa, Cédric, Nini et tous les stagiaires qui sont également passés parmi nous... Nikos, je te remercie pour avoir toujours été là lorsque j'avais besoin d'explications en maths, mais aussi pour ta bonne humeur quotidienne et ta gentillesse !! Sophie, la fofolle nouvelle venue dans l'équipe, une vraie bouffée d'air frais, toujours partante pour de grandes rigolades. Merci pour tous les moments super sympas qu'on a passé ensemble notamment le badminton les vendredis, le congrès à Milan... Je te remercie pour avoir toujours été là pour me donner confiance dans mon travail, pour le temps que tu as pris pour m'aider à préparer les questions la veille du jour J. Mais je te remercie également et d'autant plus pour les vraies discussions qu'on a eu toutes les deux, concernant toi ton super papa, moi ma petite maman... Ca fait du bien de pouvoir vider son sac de temps en temps, alors merci pour tout cela ☺ !! Vivi... ah notre super Vivi, il y a tellement de choses à dire, je vais essayer d'être concise !! Vivi tu auras été la première personne à me former au labo pendant un TP de M2. J'avais déjà trouvé à ce moment là que tu étais une très belle et douce personne. Ce fut un vrai bonheur de te voir tous les jours, et aussi de t'entendre (pas seulement ta petite voix bien portante, mais surtout le bling bling bling de tes clés à chaque pas dans les couloirs ☺), et puis les éternels discours sur la confiance en soi et les confidences... tout ça va vraiment me manquer !! Au tour de Mel maintenant... je t'ai déjà dit beaucoup de choses durant ton pot de départ pour la Nouvelle Calédonie, mais ce que je peux te redire de nouveau c'est que je me sens vraiment très chanceuse de t'avoir eu pour formatrice à la paillasse !! Je n'aurais pas pu espérer mieux en termes d'appui technique, de rigueur, de prise de conscience de tous les biais nous entourant, alors je te remercie chaleureusement pour tout cela !! Je passe maintenant à mes acolytes du bureau 106 : Gaëlle et Walid... halalalala... ce bureau, nous trois, c'est ce qui va le plus me manquer !! Je crois qu'il n'y a même pas de mot pour décrire ce que vous m'inspirez... alors je vous dirais juste que nos discussions vont me manquer, les petites blagues vont me manquer, et surtout « cœur cœur cœur » !! Walid je ne te remercierai jamais assez de m'avoir

envoyé cette offre de postdoc à laquelle j'ai été prise !! Et puis toi Gaëlle, tu sais que tu as été ma magnifique rencontre de l'année 2015... Vive la qualité !!! Et Chri-chri !! Et le Saint-Véran !! Une chose dont je suis vraiment certaine, c'est que même si cette époque du bureau 106 est terminée, et bien ce n'est qu'un tout petit au revoir très court qui s'annonce et une très belle amitié reste !! Sam... encore une très belle rencontre durant cette expérience. Il y a également tellement à dire !! C'est impossible de tout écrire, alors je te dirai juste un énorme merci pour 3 choses : (1) merci pour ton aide plus que précieuse au boulot, avec les stat, R, les ppt, les discussions, j'ai énormément appris, et comme je n'aurais pas pu être mieux formée avec Mel à la paillasse, et bien je n'aurais pas pu être mieux formée à la gestion des données et leurs traitements qu'avec toi ☺ (2) merci pour toutes les discussions personnelles qu'on a eu, le très fort soutien que tu m'as apporté lors du décès de ma mère et lors de mon changement de vie. Et (3) merci pour la découverte de toutes ces musiques de merde que tu écoutais !! Vive la moustache !!!!! Je remercie aussi Céline, avec qui j'ai fait ma première sortie au terrain et mes premiers prélèvements de sols !! Merci à mes collègues thésards Vince et Flo, qui m'ont beaucoup appris sur R et qui m'ont laissé de jolis dessins un peu partout sur mes papiers (même un sur la feuille d'une de mes plante, la pauvre !)... Merci aussi Kanto pour ta gentillesse et ta bonne humeur et d'avoir été toujours là pour rendre service !! Un immense merci à Pierrot et Seb avec qui j'ai eu la chance de rédiger mon premier article !! Ça a été un vrai bonheur d'apprendre tous les rouages à vos côtés !! Un merci Pierrot pour ta bonne humeur et tranquillité quotidienne, hyper calmante et ressourçante !! Et merci Seb pour m'avoir formé à la bioinformatique, au pipeline, pour ta patience lors de la résolution de ma montagne de problèmes !! Un grand merci à Fafa, mon sauveur en informatique !! J'ai finalement réussi à me dépatouiller sans toi ces deux dernières années, incroyable !! ☺ Et merci également pour tous les groupes de musique que tu m'as fait découvrir, ta bonne humeur et tes conneries quotidiennes !! Et surtout, je te remercie d'avoir été le petit chouchou de Rosine, grâce à ça on aura bien rigolé !! Passons maintenant aux trois énergumènes avec qui j'ai le plus rigolé, les trois super pouffiasses Tiff, Juju et Lulu !! Merci pour votre amitié, pour tous ces moments de rigolades pendant les manips et en dehors du labo, les petites vacances ensemble !! Vous êtes géniales !! Et pour rejoindre ces trois pouffiasses je remercie AL et Amandine avec qui on a pu faire de très sympas balades à cheval !! C'était chouette d'avoir croisé votre route au labo et j'espère bien continuer d'avoir de vos nouvelles par la suite !! Florence, je te remercie pour ton amitié, ton écoute, ta gentillesse et ton naturel !! Ça m'a beaucoup apporté de pouvoir discuter avec toi, c'était un plaisir de te voir au quotidien !!

Et puis je crois que je garderai toujours en mémoire le jour où on est venu au boulot avec la même robe sans le vouloir. Quel grand moment... de gêne total !! ☺

Je vais maintenant prendre un peu de temps pour remercier d'autres personnes du labo qui ont eu une place importante dans ma vie !! Je vais d'abord commencer par l'équipe qui m'a accueilli durant mon stage de M1, et dire un grand merci à Pascal et Dominique qui m'ont donné envie de faire de la recherche. Un merci aussi aux thésardes de l'époque, Aude la babacool et Anne-Laure la body-boxeuse, avec qui j'ai passé des moments forts sympathiques aussi bien au labo par leur bonne humeur, qu'à l'extérieur lors de soirées un peu trop arrosées ou encore lors de petits voyages... Une chouette amitié qui s'est construite et qui j'espère va durer encore longtemps. Un immense merci à Seb, pour les petits thés quotidiens, pour avoir été d'un énorme soutien psychologique et encore plus lors de ces derniers mois de rédaction, mon confident, un véritable ami !! Je remercie aussi David, Christian, Véronique, Nadine et Charline pour leur gentillesse quotidienne. Chachou... ma belle rencontre de l'année 2014. Une personne merveilleuse, intelligente, rigolote, toujours à l'écoute, passionnée par son travail ce qui est un vrai bonheur au quotidien. Tu m'as tellement apporté Chachou, au labo mais aussi tous les moments qu'on a partagé à l'extérieur... les footings au lac Kir, toutes les soirées à papoter, les sorties, la découverte de la batucada... merci merci merci... Un grand merci aussi à toutes les personnes que j'ai pu rencontrer au Journal Club (Benoît, Luiz, Lisou, Popo, Vincent, Ian, Yuko, Alice, Lény, Maud...) pour parler des joies, des galères vécues durant la thèse, c'était chouette de pouvoir échanger sur nos ressentis. Un immense merci également à Catherine, Fabienne, Pauline, Sylvie, Stéphanie, Claudine pour toute la gestion administrative, toujours là pour dépanner même au dernier moment, et pour leur gentillesse quotidienne!! Un immense merci à BLB, notre super Bernard, pour ces très nombreux dépannages informatiques !! Un merci de façon générale à toutes les personnes du labo non citées que j'ai eu la chance de rencontrer.

Je vais maintenant remercier quelques personnes très chères à mon cœur (il y en a tellement) ne faisant pas parties du labo. Je vais commencer par mes supers amis de fac : Amélia, Camille, Cindy, Elo, Delphine, Cédric, Alex, Jérémy... merci pour votre soutien depuis qu'on s'est quitté, merci d'être toujours resté présent pour partager de merveilleux moments, moments qui m'ont grandement aidé à tenir en période de stress !! Vous êtes géniaux !! Un grand merci à Bénédicte pour sa gentillesse, à ma chère Sandra, une vraie amie qui a su me comprendre, me supporter et me motiver pour me défouler quand j'en avais besoin. Un grand merci à ma grosse bête bleue, autrement surnommé mon troubadour à roulettes ou encore mon lulubellule, qui a eu le privilège de partager ma vie lors de ces

derniers mois de thèse, les plus intenses, le pauvre !! Je n'arriverais jamais à te remercier assez pour tous les petits moments passés avec toi et qui m'ont permis de m'éclater, rigoler, me vider la tête, me détendre, et qui m'ont permis de ne pas devenir cinglée à l'arrivée de la fin de rédaction. Enfin un immense merci à ma famille qui m'a accompagné de près ou de loin lors de ces trois années : bouts, mon super papa, ma mamagamelle, Loïc, Kevin, Coco, Jean-Loupe, Geneviève, Philippe, Renée, Jean, les papy et mamies et tous les autres... Vous êtes extraordinaires et je ne pourrais pas espérer une famille plus au top que ça !!!

Enfin voilà, je vous remercie tous, pour m'avoir fait grandir, mûrir (bon ok la confiance en moi c'est pas encore ça mais y'a du mieux !!), de m'avoir fait vivre des moments extra, de m'avoir entouré d'amitié, pour votre soutien dans les coups durs, pour nos moments de grands délires et pour tous les souvenirs que je vais garder précieusement avec moi...

SOMMAIRE

Introduction	1
Chapitre I. Synthèse bibliographique.....	10
I. Le sol, rôle et importance.....	11
I.1. Le sol, matrice hétérogène et structurée.....	12
I.2. Le sol et les services écosystémiques	13
I.3. La biocénose du sol.....	15
I.3.1. La faune.....	15
I.3.2. La microflore.....	16
I.3.3. La flore végétale.....	17
II. Les communautés microbiennes du sol	17
II.1. Implication des microorganismes dans le fonctionnement du sol	18
II.2. Outils de caractérisation des communautés microbiennes	22
II.2.1. Mesures de la biomasse microbienne des sols.....	23
II.2.2. Mesures de la diversité taxonomique des communautés microbiennes.....	24
III. Outils de diagnostic de la qualité biologique des sols : les bioindicateurs	27
III.1. La bioindication, une méthode de diagnostic efficace	27
III.2. Les bioindicateurs d'impact et d'accumulation.....	28
III.3. Les différents acteurs de la bioindication.....	29
III.3.1. Bioindication par la flore végétale.....	29
III.3.2. Bioindication par les ingénieurs de l'écosystème.....	30
III.3.3. Bioindication par les régulateurs biologiques de l'écosystème	30
III.3.4. Bioindication par les ingénieurs chimiques de l'écosystème	31
III.3.4.1. Bioindicateurs microbiens quantitatifs	32
III.3.4.2. Bioindicateurs microbiens qualitatifs	33
Chapitre II. Standardisation de deux bioindicateurs microbiens.....	36
Partie A. La biomasse moléculaire microbienne : variabilité méthodologique.....	37
Partie B. La diversité taxonomique des bactéries et des champignons : robustesse technique	56
Chapitre III. Suivi par des bioindicateurs microbiens de la réhabilitation d'un sol pollué	79
Partie A. Abondance et diversité des communautés de bactéries et de champignons.....	82
Partie B. Composition taxonomique des communautés de bactéries et de champignons	90
Chapitre IV. Réponse des bioindicateurs aux changements du travail du sol et de la gestion des résidus de culture.....	100
1. Introduction	102
2. Matériel et méthodes	104
2.1. Présentation du site expérimental.....	104
2.2. Stratégie d'échantillonnage	106

2.3. Caractéristiques des sols étudiés	106
2.4. Analyses moléculaires des communautés microbiennes	107
2.4.1. Biomasse moléculaire microbienne.....	107
2.4.2. Diversité des bactéries et des champignons.....	107
2.5. Analyses bioinformatiques	108
2.6. Analyses statistiques	108
3. Résultats et discussion.....	109
3.1. Etat initial des communautés microbiennes du site.....	109
3.1.1. Biomasse moléculaire microbienne et diversité des bactéries et des champignons	110
3.1.2. Structure des communautés de bactéries et de champignons	111
3.2. Différenciation des communautés microbiennes en réponse aux différents traitements.....	112
3.2.1. Biomasse moléculaire microbienne et diversité des bactéries et des champignons	113
3.2.2. Structure et composition taxonomique des communautés bactériennes.....	114
3.2.3. Structure et composition taxonomique des communautés de champignons.....	117
4. Conclusion.....	120
5. Références bibliographiques	121
Conclusion & Perspectives	127
1. Rappel des principaux objectifs de la thèse.....	128
2. Conclusion.....	128
2.1. Standardisation de deux bioindicateurs microbiens : la biomasse moléculaire microbienne et la diversité taxonomique des bactéries et des champignons	128
2.2. Suivi par des bioindicateurs microbiens de la réhabilitation d'un sol pollué.....	130
2.3. Réponse des bioindicateurs aux changements du travail du sol et de la gestion des résidus de culture.....	131
2.4. Conclusion générale	132
3. Perspectives	132
3.1. Affiner l'évaluation de la variabilité technique des indicateurs	133
3.2. Hiérarchiser l'impact des pratiques agricoles sur les bioindicateurs.....	133
3.3. Effectuer des essais à long terme	134
3.4. Développer des référentiels d'interprétation	134
3.5. Faire le lien entre la diversité et le fonctionnement biologique du sol.....	135
Références bibliographiques.....	136
Annexe, article soumis dans <i>Agriculture, Ecosystems & Environment</i>.....	165

LISTE DES FIGURES

▪ Introduction

Figure 1 : Variation de la biodiversité en fonction des changements globaux et importance de la biodiversité comme facteur modifiant les services écosystémiques et le bien-être de l'Homme.....3

Figure 2 : La biodiversité des sols4

Figure 3 : Les services écosystémiques rendus par le sol5

Figure 4 : Bioindicateurs microbiens étudiés pendant la thèse8

▪ Chapitre I

Figure I.1 : Le sol, siège d'importants échanges de matière et d'énergie11

Figure I.2 : Les services écosystémiques14

Figure I.3 : Arbre de la vie fondé sur une phylogénie résultant de la comparaison des séquences de gènes fondamentaux pour le processus vivant, en particulier les gènes codant pour les ARN des ribosomes15

Figure I.4 : Tailles respectives des animaux de la microfaune, de la mésofaune, de la macrofaune et de la mégafaune16

Figure I.5 : Schéma de l'agrégation hiérarchique du sol19

Figure I.6 : Schéma présentant les différentes étapes de la technique du pyroséquençage (selon Roche®) dans le cadre de l'analyse d'un échantillon de sol26

Figure I.7 : Les différents niveaux de réponse des bioindicateurs29

▪ Chapitre II

Figure II.1 : Biomasses moléculaires microbiennes ($\mu\text{g ADN/g sol}$) obtenues pour les sols d'Epoisses, Lusignan, Réthoville et Breuil.....45

Figure II.2 : Biomasses moléculaires microbiennes ($\mu\text{g ADN/g sol}$) obtenues les trois jours d'analyse (Jour 1, Jour 2, Jour 3) ainsi que les valeurs des trois jours poolées (Inter-jours) pour les quatre sols de références (A) Epoisses, (B) Lusignan, (C) Réthoville, (D) Breuil46

Figure II.3 : Biomasses moléculaires microbiennes ($\mu\text{g ADN/g sol}$) obtenues par les manipulateurs expérimenté (Exp.), intermédiaire (Inter.) et novice pour les quatre sols de références (A) Epoisses, (B) Lusignan, (C) Réthoville, (D) Breuil48

Figure II.4 : Schéma récapitulatif de la variabilité technique du bioindicateur (pourcentages de variation de l'écart-type)	49
--	-----------

Figure II.5 : Biomasses moléculaires microbiennes obtenues par six échantillonnages aléatoires (3, 5, 10, 20, 30, 60 valeurs) pour les sols de (A) Culture avec labour, (B) Culture sans labour, (C) Prairie .	51
---	-----------

Figure II.6 : Schéma récapitulatif de la variabilité au terrain de la biomasse moléculaire microbienne (pourcentages de variation de l'écart-type)	52
---	-----------

▪ **Chapitre IV**

Figure IV.1 : Plan du dispositif expérimental SOERE ACBB d'Estrées-Mons	105
--	------------

Figure IV.2 : Stratégie d'échantillonnage des sols sur le dispositif expérimental SOERE ACBB d'Estrées-Mons.....	106
---	------------

Figure IV.3 : Cartographie de la biomasse moléculaire microbienne à l'état initial de l'essai (Mars 2010) avant l'application des cinq traitements	110
---	------------

Figure IV.4 : Analyses multidimensionnelles non-métriques (NMDS) des communautés bactériennes (A) et de champignons (B) en 2010 à l'état initial de l'essai avant l'application des cinq traitements	112
---	------------

Figure IV.5 : Analyses multidimensionnelles non-métriques (NMDS) des communautés bactériennes en 2014 après quatre ans de différenciation des cinq traitements pour les horizons de sol 0-5 et 5-20 cm	115
---	------------

Figure IV.6 : Analyses multidimensionnelles non-métriques (NMDS) des communautés de champignons en 2014 après quatre ans de différenciation des cinq traitements pour les horizons de sol 0-5 et 5-20 cm	118
---	------------

LISTE DES TABLEAUX

▪ Chapitre I

Tableau I.1 : Utilisation de différents bioindicateurs	31
---	-----------

▪ Chapitre II

Tableau II.1 : Texture et caractéristiques physico-chimiques des sols de référence	41
---	-----------

Tableau II.2 : Texture et caractéristiques physico-chimiques des parcelles de référence	42
--	-----------

Tableau II.3 : Etude des réplicabilités intra-jour et de la répétabilité inter-jours de la biomasse moléculaire microbienne mesurées en termes de pourcentages de variation de l'écart-type par rapport à la valeur moyenne de biomasse moléculaire microbienne	47
--	-----------

Tableau II.4 : Etude des réplicabilités intra-manipulateur et de la répétabilité inter-manipulateurs de la biomasse moléculaire microbienne mesurées en termes de pourcentages de variation de l'écart-type par rapport à la valeur moyenne de biomasse moléculaire microbienne.....	48
---	-----------

▪ Chapitre IV

Tableau IV.1 : Rotations de cultures effectuées sur le dispositif expérimental SOERE ACBB d'Estrées-Mons	105
---	------------

Tableau IV.2 : Présentation des 5 traitements étudiés sur le dispositif expérimental SOERE ACBB d'Estrées-Mons	105
---	------------

Tableau IV.3 : Texture et caractéristiques physico-chimiques des sols étudiés en 2009	107
--	------------

Tableau IV.4 : Valeurs de biomasse moléculaire microbienne et des indices de diversité obtenues en 2010 à l'état initial de l'essai	111
--	------------

Tableau IV.5 : Valeurs de biomasse moléculaire microbienne et de l'indice de richesse en 2014 après quatre ans de différenciation des traitements agricoles	114
--	------------

Introduction

Depuis une soixantaine d'années, la politique agricole menée en France a eu pour objectif d'intensifier l'agriculture afin d'augmenter la productivité par hectare et maximiser les performances économiques des exploitations. La nécessité d'augmenter ces rendements de production s'est faite tout d'abord avec l'augmentation des surfaces agricoles et donc par la modification de l'utilisation des terres à grande échelle. En effet les surfaces utilisées pour les grandes cultures céréalières ont augmenté en passant de 11,8 millions d'hectares en 1950 à 13,1 millions en 2013 (<http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/memo14territoire.pdf>). Ceci s'est fait au détriment des surfaces cultivées avec des espèces pérennes et des écosystèmes naturels. En parallèle, l'agriculture a connu aussi une intensification des pratiques en termes de mécanisation, de sélection végétale et d'utilisation d'intrants de synthèse (engrais, pesticides). Dans ce contexte, l'augmentation des rendements s'est faite par l'artificialisation des sols agricoles et la protection chimique des cultures contre les plantes adventices compétitrices et les organismes ravageurs (Bonnefond, 1970; <http://www.senat.fr/rap/110-618/110-6181.html>). Toutefois, en face de cette agriculture productiviste, il est maintenant démontré que le bilan environnemental payé est assez lourd. Dans le récent Millenium Ecosystem Assessment (Duraiappah et al., 2005), l'agriculture est pointée du doigt comme une des activités humaines contribuant significativement à la perte de biodiversité terrestre à l'échelle planétaire. Cette perte de diversité peut s'expliquer par une dégradation des habitats et une baisse de leur variabilité, mais aussi par une baisse de la qualité et de la quantité des ressources disponibles pour les organismes vivants (Turbé et al., 2010; Helgason et al. 1998). Cette diversité biologique est à la base des services d'approvisionnement et de régulation de nos écosystèmes (Altieri, 1999) qui agissent directement sur le développement et le bien être des sociétés humaines (Figure 1). De plus, elle est impliquée dans la stabilité des écosystèmes *via* leur capacité de résistance et de résilience consécutivement à une perturbation. La biodiversité est donc un élément clé de la stabilité des agrosystèmes et donc de la durabilité des systèmes de production (Duraiappah et al., 2005; Swift et al., 2004). Dans ce contexte, où l'agriculture dégrade les fonctions biologiques et les services qui peuvent répondre à ces objectifs de productivité et de qualité des productions, il devient nécessaire de repenser notre modèle agricole.

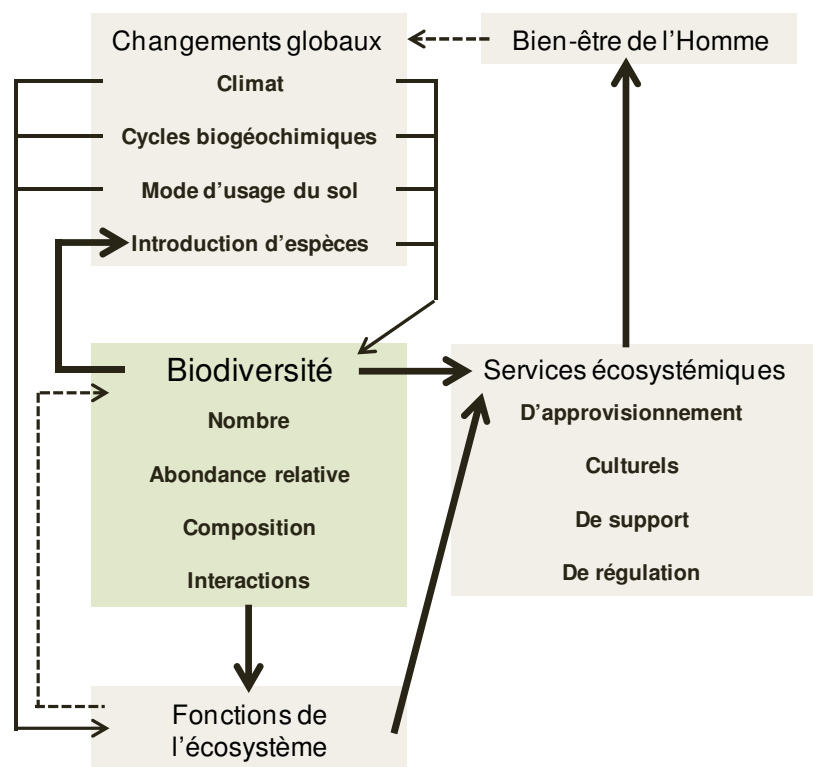


Figure 1. Variation de la biodiversité en fonction des changements globaux et importance de la biodiversité comme facteur modifiant les services écosystémiques et le bien-être de l'Homme. *Source : Duraiappah et al., 2005.*

Ces dernières années, les recherches sur l'écologie des systèmes agricoles se sont multipliées. Les agronomes et les écologues ont combiné leurs efforts pour étudier les problèmes auxquels sont confrontés les systèmes de production et permettre de concilier les enjeux économiques de l'agriculture avec les enjeux environnementaux. Ces recherches ont conduit au développement d'un domaine, l'agroécologie, qui peut donc être considérée comme un rapprochement de l'agriculture et de l'écologie. Dans ce contexte, les systèmes de production agricole doivent s'appuyer sur les fonctionnalités des écosystèmes, en réduisant les pressions environnementales et en préservant les ressources naturelles (Gliessman, 1990; Altieri, 2002). L'agroécologie consiste donc à produire autrement en formant les agriculteurs à la réduction de l'usage des pesticides, aux méthodes naturelles de protection des végétaux, à l'engagement dans un développement durable, à la valorisation des effluents d'élevage, à l'agriculture biologique, à la sélection des semences adaptées ou encore à l'utilisation des arbres pour améliorer les productions agricoles (<http://agriculture.gouv.fr/10-cles-pour-comprendre-lagro-ecologie>). Elle prend donc en compte tous les compartiments de la biosphère terrestre qui, de près ou de loin, sont en interactions avec les agrosystèmes.

Parmi les différents compartiments de la biosphère terrestre impactés par les activités agricoles (sol, eau, atmosphère), le sol a été fortement étudié depuis une trentaine d'années de par son rôle majeur en tant que support des cultures et réservoir important de nutriments. A ce titre, ces études ont essentiellement portées sur l'évolution de ses propriétés physico-chimiques en termes d'érosion, de compaction, d'acidification et de pollution. En revanche, les études ayant contribué à évaluer l'impact des pratiques agricoles sur la composante biologique des sols sont plus récentes et encore partielles. Pourtant, de par sa structure hétérogène, sa capacité de rétention d'éléments nutritifs, son rôle tampon vis à vis des perturbations environnementales et sa position d'interface, il héberge une grande quantité et diversité d'organismes vivants (Ranjard & Richaume, 2001; Mummey et al., 2006) (Figure 2). Il occupe donc un rôle très important dans le maintien de la biodiversité et la conservation d'un patrimoine génétique immensément riche impliqué dans de nombreuses fonctions environnementales (*i.e.* fertilité, dépollution) à la base de nombreux services écosystémiques (Figure 3) (Duraiappah et al., 2005; Pulleman et al., 2012; Turbé et al., 2010).

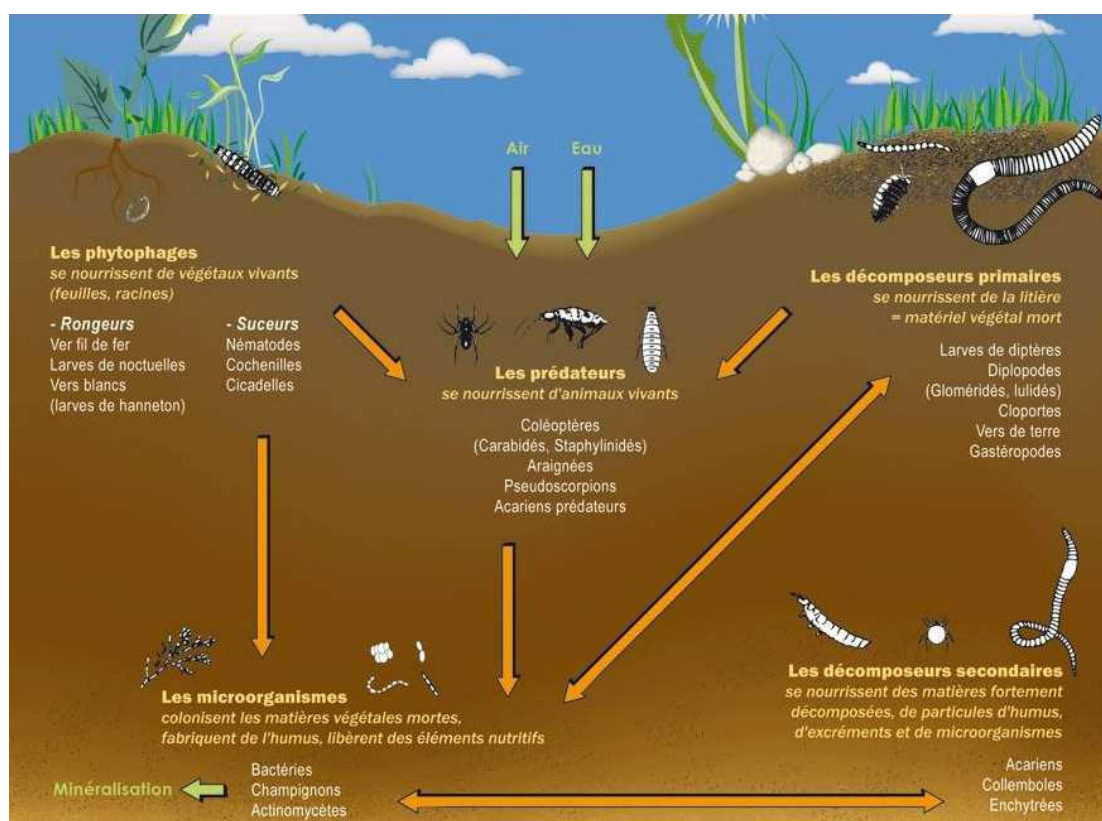


Figure 2. La biodiversité des sols. Source : CNRS © Amélie Rochedreux.

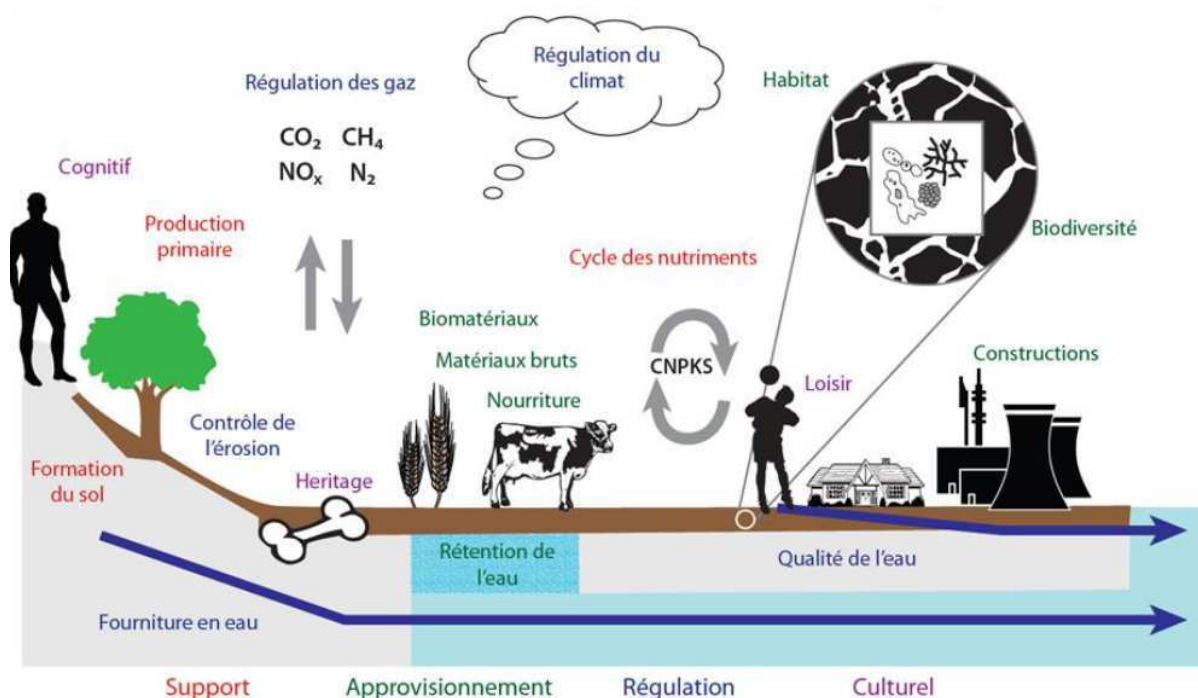


Figure 3. Les services écosystémiques rendus par le sol. Source : Atlas européen de la biodiversité du sol, 2010.

Dans le nouveau contexte agroécologique où les parcelles agricoles ne sont plus seulement valorisées par leur productivité mais également par leur capacité à fournir durablement diverses catégories de biens et de services, il est absolument nécessaire de disposer d'outils de bioindication capables de rendre compte de l'impact des pratiques agricoles sur les fonctions et services rendus par les sols. La CBD (Convention sur la Diversité Biologique) a fait part d'une demande d'utilisation de bioindicateurs permettant de suivre l'évolution des ressources naturelles et de la biodiversité. Cette surveillance effectuée permettrait de fournir des informations sur ce qui doit être fait pour stopper les processus lorsque les tendances sur les écosystèmes apparaissent négatives (Pulleman et al., 2012). Ces outils de bioindication, ou bioindicateurs peuvent être définis comme des organismes (ou communautés d'organismes) permettant d'identifier et quantifier aussi bien les perturbations que les transformations des sols et les impacts en découlant, et par conséquent suivre la durabilité des systèmes de production agricoles (Bispo et al., 2009; Pankhurst et al., 1997; Fierer & Ladau, 2012).

Parmi les organismes indigènes du sol, les microorganismes, comprenant principalement des bactéries et des champignons, sont les plus nombreux et les plus diversifiés (Curtis & Sloan, 2005). En effet il est estimé que dans un gramme de sol l'abondance moyenne des microorganismes est d'environ 10^9 individus et que leur biodiversité s'élève entre 10^3 et 10^6 espèces (Torsvik & Øvreås, 2002). Ces microorganismes

telluriques sont à la base de la chaîne trophique et participent au fonctionnement et à la qualité des sols puisqu'ils peuvent décontaminer les sols pollués (bioremédiation) (Garbisu & Alkorta, 1999; Bouchez et al., 1996; Haritash & Kaushik, 2009), transformer la matière organique en matière minérale et ainsi recycler le carbone et les nutriments minéraux (azote, phosphore, potassium) (Barrios, 2007; Hallin et al., 2009; Paul, 2014). Ceci permet d'une part un bon développement végétal (fertilité biologique) (Torsvik & Øvreås 2002; Tiedje et al., 1999) et d'autre part de diminuer les flux de polluants vers les nappes phréatiques et l'atmosphère. Ils sont également impliqués dans la structuration du sol par la formation d'agrégats (Verbruggen et al., 2010; Tang et al., 2011). Ces communautés microbiennes sont donc le support d'une diversité fonctionnelle considérable et nécessaire pour le fonctionnement biologique du sol et des écosystèmes (Tiedje et al., 1999). De plus, de par leur petite taille, leur temps de génération court, leurs capacités métaboliques variées, leur implication dans les services rendus par les sols et leur sensibilité aux modifications des équilibres biogéochimiques en réponse à des perturbations extérieures (Strickland & Rousk, 2010; Ranjard et al., 2006), ils apparaissent comme de très bons bioindicateurs d'état et de fonctionnement de la qualité des sols. Différentes études ont démontrées leur sensibilité aux pratiques agricoles et aux changements de mode d'usage des sols (Constancias et al., 2014; Constancias et al., 2015; Dequiedt et al., 2011; Yao et al., 2000; Kushwaha et al., 2000).

Depuis une trentaine d'années des bioindicateurs microbiens dits « classiques » sont utilisés pour rendre compte de la qualité des sols, et certaines procédures pour les obtenir ont même été normalisées. Il s'agit notamment de la méthode de fumigation/extraction décrite par Vance et al. (1987) qui permet d'estimer la biomasse microbienne des sols par mesure du carbone extractible total de la biomasse organique (ISO 14240). Des méthodes pour mesurer la respiration microbienne des sols et déterminer l'activité microbienne (établir l'effet d'intrants tels que des polluants, des amendements...) sont également normalisées (norme ISO 16072).

Depuis 20 ans, des outils moléculaires ont été développés afin d'étudier les microorganismes telluriques via l'extraction et de la caractérisation des ADN microbiens des sols (Maron et al., 2011; Ranjard et al., 2001). Ces méthodes moléculaires permettent de déterminer l'abondance, la diversité taxonomique et fonctionnelle des communautés microbiennes des sols (Fierer et al., 2007). De nombreuses méthodes permettant d'extraire l'ADN microbien des sols ont été développées (kit, protocoles « maison », norme ISO). Plus récemment, de nouvelles approches dites de « métagénomique environnementale »,

permettent d'aborder de façon représentative l'immense diversité taxonomique et fonctionnelle grâce à des technologies de séquençage haut-débit (*i.e.* la technique de pyroséquençage par la technologie 454, illumina). Ces approches permettent pour la première fois d'estimer réellement les indices de diversité pour les communautés microbiennes des sols en termes de richesse spécifique et d'équitabilité entre les espèces, et leur composition taxonomique.

Comme souvent constaté, les phases de développement de nouvelles techniques dans le domaine de la microbiologie environnementale se résument à une application « excitatoire » sur de nombreuses situations environnementales sans pour autant prendre le recul d'une bonne évaluation de la robustesse technique et de la représentativité de ces nouveaux outils. Pour exemple, il résulte de ceci qu'un nombre très important de protocole d'extraction de l'ADN du sol sont disponibles mais sans réel consensus international sur la meilleure procédure à appliquer (Terrat et al., 2012). De même, les techniques de séquençage massif, bien que très prometteuses et largement appliqués sur de nombreuses situations environnementales, sont encore largement méconnues quant à leur robustesse technique et leur représentativité. Il en résulte que les résultats disponibles entre les différentes études sont très peu comparables. Ce manque de généricité constitue donc un frein au transfert de ces outils en tant que bioindicateurs microbiens puisque ce dernier doit remplir plusieurs exigences : il doit être pertinent pour analyser le fonctionnement du sol, être capable de discriminer des sols sur la base de leur sensibilité à différentes conditions environnementales (et/ou perturbations), être facile d'utilisation et accessible aussi bien pour les experts que pour les non spécialistes, et présenter un faible coût (Ritz et al., 2009; Pulleman et al., 2012; Turbé et al., 2010). Par conséquent, la robustesse, la spécificité et la sensibilité des indicateurs doivent être éprouvées dans un cadre standardisé et appliquées dans des situations aussi bien expérimentales au laboratoire qu'en situations réelles sur le terrain. Aujourd'hui force est de constater que malgré la multitude d'indicateurs disponibles pour estimer la biodiversité microbienne des sols, il existe un manque de standardisation des bioindicateurs et un manque de référentiels de comparaison (Pulleman et al., 2012).

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette thèse dont les objectifs principaux ont été de standardiser des procédures techniques devant amener à la validation de deux bioindicateurs microbiens et de déterminer leur gammes de variation et leur sensibilité dans des situations expérimentales. Les deux bioindicateurs étudiés ont été la biomasse moléculaire microbienne et la diversité taxonomique des bactéries et des champignons (obtenue par une approche de

métagénomique basée sur le pyroséquençage des ADNr 16S et 18S, respectivement) (Figure 4). La biomasse moléculaire microbienne est un bioindicateur microbien très global renseignant sur l'abondance des microorganismes du sol et donc sur la qualité de celui-ci en termes de fertilité par le recyclage du carbone et des nutriments minéraux. La diversité taxonomique a été choisie comme second bioindicateur car elle permet d'obtenir des informations très précises sur la richesse des microorganismes du sol et leur composition taxonomique. Ces informations de diversité fournissent des informations sur l'activité des microorganismes puisqu'à partir de leur phylogénie et de leur écologie, certains groupes sont reconnus responsables de processus tels que la dénitrification, la nitrification ou encore l'oxydation du méthane (Torsvik & Øvreås, 2002) et donc liés à la minéralisation de la matière organique ou encore la dégradation de polluants.

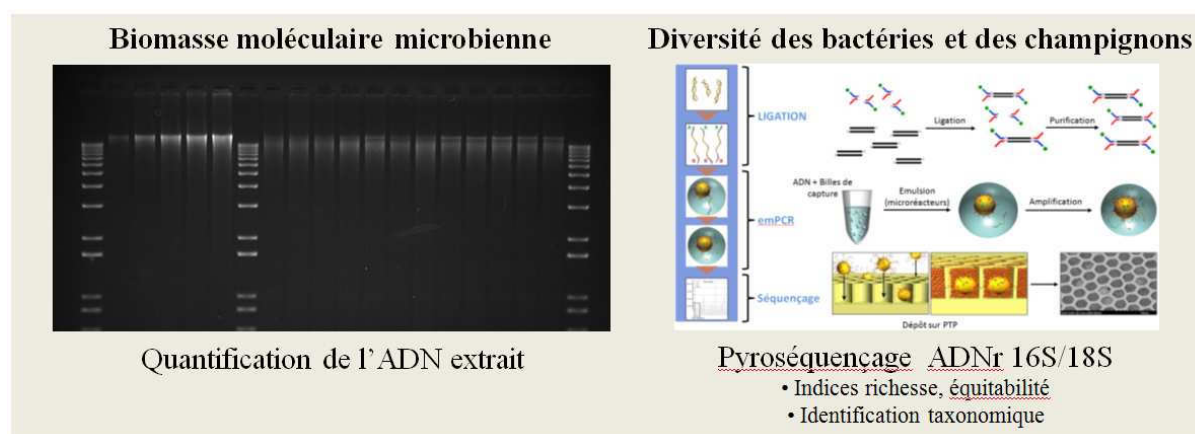


Figure 4. Bioindicateurs microbiens étudiés pendant la thèse.

Après avoir étudié leur robustesse technique, ces indicateurs ont été utilisés dans différents contextes agricoles, afin de les valider pour évaluer les pratiques agricoles de systèmes de culture conventionnels (travail intensif du sol, exportation des résidus de culture, pollution) et innovants (suivi de réhabilitation d'un sol agricole pollué, restitution de résidus de culture, arrêt du travail du sol). Pour répondre à ces objectifs, la thèse se décline en quatre chapitres.

- Le Chapitre I consiste en un état de l'art du contexte scientifique et technique dans lequel s'inscrit cette thèse en termes de rôle des communautés microbiennes sur le fonctionnement du sol et sur l'importance de disposer de bioindicateurs microbiens pour mesurer l'état et le fonctionnement biologique du sol.

- Le Chapitre II décrit les résultats acquis concernant la standardisation de la biomasse moléculaire microbienne et de la diversité taxonomique. La variabilité méthodologique de la biomasse moléculaire microbienne a été étudiée en termes de réplicabilité, de répétabilité et de sensibilité à partir de sols choisis comme références de par leur mode d'usage et leurs caractéristiques physico-chimiques contrastés. L'étude a été effectuée afin de valider cet indicateur de façon robuste, un des objectifs à court terme étant d'optimiser la robustesse de la biomasse moléculaire et de la proposer comme une mesure de routine de la qualité microbiologique des sols.

La caractérisation de la diversité taxonomique des bactéries et des champignons a été abordée par une approche basée sur le séquençage massif de gènes ribosomiques (ADNr 16S et 18S). La représentativité et donc la reproductibilité de cette approche a été évaluée dès l'étape d'extraction d'ADN et intégrant la séquence technique jusqu'à l'analyse bioinformatique. Ce travail a donné lieu à une publication dans *Microbial Biotechnology*.

- Le Chapitre III correspond à une validation technique des deux bioindicateurs dans un contexte agronomique particulier. L'étude a consisté à suivre la réhabilitation du patrimoine microbien d'un sol pollué par les métaux lourds et les micropolluants organiques (due à une irrigation depuis 100 ans par des eaux usées), sur lequel une culture à vocation énergétique, le *Miscanthus x giganteus*, a été implantée. Ces travaux ont donné lieu à deux publications dans *Environmental Chemistry Letters*. La première porte sur les résultats en termes de biomasse microbienne et de descripteurs de diversité des bactéries et des champignons (richesse, équitabilité). La seconde publication porte sur les résultats en termes de composition taxonomique des communautés bactériennes et de champignons, et de l'impact positif de la plantation du miscanthus pour relancer l'activité microbienne de sol pollué.

- Le Chapitre IV consiste à suivre la réponse des deux bioindicateurs microbiens à des pratiques agricoles variées en termes de travail du sol (labour vs travail réduit) la gestion des résidus de culture (restitution vs exportation), et le type de culture (pérenne avec plantation de Switchgrass vs annuelle avec rotation de cultures).

Cette thèse a été financée par une allocation de recherche du Ministère de la Recherche et réalisée au sein de l'UMR 1347 Agroécologie à l'INRA de Dijon et plus particulièrement au sein de l'équipe BioCom (Biologie des Communautés microbiennes) avec l'appui logistique (conservation des échantillons) et le recul technique (caractérisation moléculaire des communautés microbiennes) de la plateforme technique GenoSol.

Chapitre I :

Synthèse bibliographique

L'objectif de cet état de l'art est de présenter le contexte scientifique dans lequel s'inscrit la thèse, c'est-à-dire l'importance des communautés microbiennes telluriques dans le fonctionnement biologique du sol et le besoin de valider des bioindicateurs afin de mesurer l'impact des activités anthropiques sur ces communautés. Cette synthèse est l'occasion de présenter les clés de compréhension techniques et conceptuelles des travaux menés et d'identifier l'origine des questions de recherche qui ont été les bases de ce travail. Ce chapitre a été structuré en trois parties : la première porte sur le sol et son importance dans les services écosystémiques ; la deuxième porte sur les communautés microbiennes telluriques qui sont les organismes clés pour la fourniture des services par le sol; et la troisième partie concerne la nécessité de développer des bioindicateurs pour mesurer l'impact des pratiques agricoles sur l'état biologique et le fonctionnement du sol dans un contexte agroécologique où la biodiversité est indispensable pour la pérennité des agro-écosystèmes.

I. Le sol, rôle et importance

Le sol correspond à la couche externe de l'écorce terrestre résultant de l'altération de la roche mère sous l'action du climat et des organismes vivants. Il se situe donc à l'interface de l'atmosphère, de l'hydrosphère, de la lithosphère et de la biosphère et est le siège d'importants échanges de matière et d'énergie (http://www.afes.fr/afes/docs/AFES_d%C3%A9finition_SOL.pdf, Figure I.1).

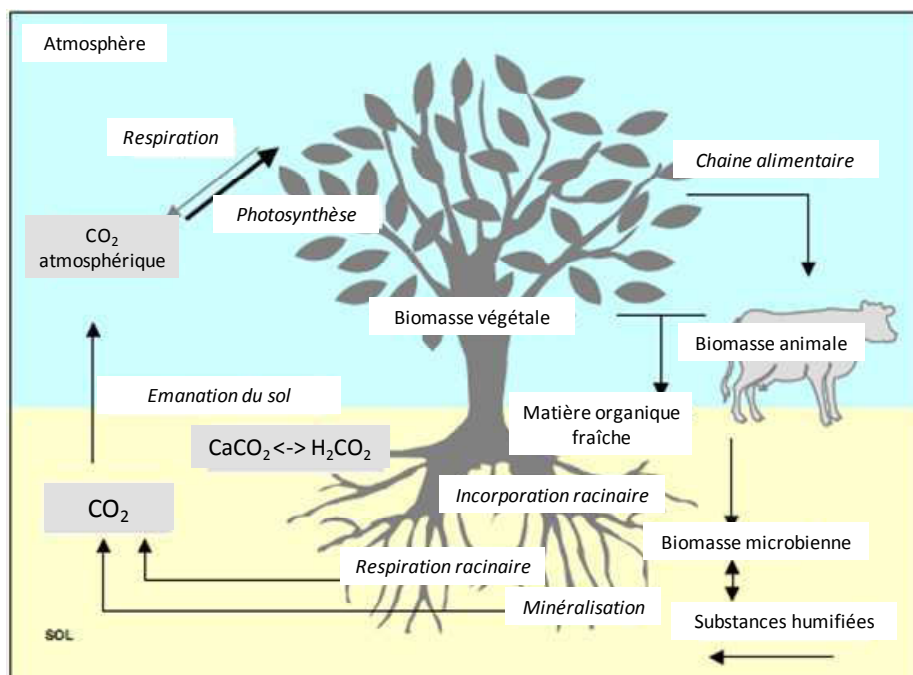


Figure I.1. Le sol, siège d'importants échanges de matière et d'énergie. Source © IRSN.

Il occupe une position clef dans les cycles globaux des matières et sa composition doit permettre un bon approvisionnement en éléments nutritifs (C, N, P, K), en eau et en oligo-éléments puisque c'est le support physique des cultures. Un sol est considéré comme fertile s'il permet de produire toute la chaîne alimentaire (animale et végétale) (Watson et al., 2002). Pour cela, il doit présenter une importante diversité d'organismes, permettre aux espèces végétales naturelles ou cultivées de se développer sans nuire à leurs propriétés, fournir des fourrages et des denrées alimentaires de bonne qualité ne menaçant pas la santé de l'Homme et des animaux (Gobat, 2010; Karlen et al., 1997). Un sol est donc considéré de qualité lorsqu'il est capable de fonctionner comme un système vivant, soutenir la productivité agricole, promouvoir la qualité de l'air et de l'eau et maintenir la santé des plantes, des animaux et des Hommes (Doran & Zeiss, 2000; Warkentin, 1995). Le sol est une ressource non renouvelable qu'il est nécessaire d'étudier et de préserver afin de l'utiliser de manière durable en regard des services écosystémiques qu'il rend aux sociétés humaines.

I.1. Le sol, matrice hétérogène et structurée

Le sol est constitué d'éléments organiques et minéraux. Ces constituants sont présents sous des états solides, liquides et gazeux.

- La fraction solide est composée de minéraux obtenus par désagrégation physique et par altération biochimique des roches. Une analyse granulométrique de ces composants permet de les classer en trois catégories : les sables allant de 50 à 2000 μm , les limons allant de 2 à 50 μm , et les argiles compris entre 0 et 2 μm . La proportion respective de ces différents éléments renseigne sur la texture minérale du sol. Cette fraction solide est également constituée de composés organiques également subdivisés en plusieurs parties : la matière organique fraîche (ou litière) constituée d'organismes vivants ou morts à différents stades de décomposition (animaux, végétaux, microbiens) ainsi que les composés émis directement dans le milieu et les excréments ; les matières héritées telles que les glucides (dont la cellulose), les lignines, les lipides (dont les résines) et les composés azotés ; et des matières humifiées (Musy, 1991; Gobat, 2010; <http://www.jymassenet-foret.fr/cours/pedologie/pedo3.pdf>).

- La fraction soluble (ou solution du sol) est un ensemble constitué de l'eau du sol et des substances qui y sont dissoutes, obtenu par précipitations et ruissellements. Ils comprennent donc les eaux et des substances telles que des glucides, des alcools, des acides organiques et minéraux et également des cations et anions (Musy, 1991; <http://www.jymassenet-foret.fr/cours/pedologie/pedo3.pdf>).

- L'atmosphère du sol est constituée de composés gazeux provenant de l'air hors sol (N_2 , O_2 , CO_2), de la respiration et des matières en décomposition (CO_2 , H_2 , CH_4 , NH_3) (Musy, 1991; Gobat, 2010).

L'épaisseur du sol est très variable (quelques centimètres à quelques dizaines de mètres) et présente le plus souvent plusieurs horizons dus à l'organisation de ces constituants. Sa structuration dépend directement de la proportion des constituants solides (texture du sol), mais aussi de la teneur en eau et de la matière organique. Le sol est structuré par assemblage de particules minérales et organiques dans des agrégats de différentes tailles (microagrégats de 2 à 250 μm , macroagrégats de 250 à plus de 2000 μm), de différentes stabilités, de différentes compositions, liés par des agents organiques et inorganiques et variant à court terme (Musy, 1991; Barrios, 2007; Bronick & Lal, 2005; Six et al., 2000). Une telle structure engendre une grande diversité de microenvironnements qui représentent autant de microhabitats pour les organismes indigènes (Lavelle, 1996; Ranjard & Richaume, 2001; Altieri, 1999; Tiedje et al., 1999).

I.2. Le sol et les services écosystémiques

A l'échelle de la biosphère, le sol rend de nombreux services nécessaires au développement et la pérennité des sociétés humaines. Ils peuvent être inscrits dans quatre catégories : les services de support, d'approvisionnement, de régulation et les services culturels et sociaux (Duraiappah et al., 2005; Turbé et al., 2010; de Groot et al., 2002; Carpenter et al., 2009) (Figure I.2).

- Les services de support (ou d'auto-entretien) sont nécessaires pour la production de tous les autres services de l'écosystème. Les sols servent ainsi de support à l'Industrie, à la production primaire (agriculture), la production d'oxygène atmosphérique (photosynthèse), l'offre de l'habitat.

- Les services d'approvisionnement. Le sol, comme ressource agricole, fournit de la nourriture et des fibres. Comme ressource génétique, il abrite un patrimoine biologique très diversifié. Le sol fournit également des matériaux de construction, une ressource en eau douce et en carburants.



Figure I.2. Les services écosystémiques. *Source : Duraiappah et al., 2005.*

- Les services de régulation. Le sol permet de réguler aussi bien le climat que la qualité de l'air et des eaux. Il permet de lutter contre de nombreuses pollutions, contre les érosions hydriques et éoliennes, contre la sécheresse et contre les inondations. Il participe à la lutte contre l'effet de serre et constitue un site de stockage de divers éléments. Par filtrage, il assure la dépollution de nombreux contaminants. Il recycle certains déchets et permet la régulation des ravageurs de cultures. Il permet aussi une régulation des pathogènes humains.

- Les services culturels. Le sol rend aussi des services culturels selon les trois dimensions suivantes : il fournit des matériaux pour la production artistique (terres colorées, pigments et argiles pour la peinture et la céramique) ; il est un lieu de stockage et de protection des données anciennes touchant à l'Histoire ou au passé de notre planète (*i.e.* archéologie, archives paléo-climatiques) ; il est lui-même objet d'inspiration pour les religions, les mythes, les cultes mais aussi pour la production artistique et littéraire (Duraiappah et al., 2005).

I.3. La biocénose du sol

Les organismes vivants du sol sont très variés. En effet il est possible de retrouver aussi bien des mammifères, insectes, mollusques, que des protozoaires, des algues, des bactéries ou encore des champignons. La flore végétale peut également être considérée comme partie prenante dans la biocénose du sol de par la partie racinaire des plantes. Tous participent à la structuration et à l'évolution du sol, notamment au niveau de la fraction organique. Les organismes vivants appartiennent à trois domaines fondamentaux : *Bacteria*, *Archaea*, *Eucarya* (Figure I.3).

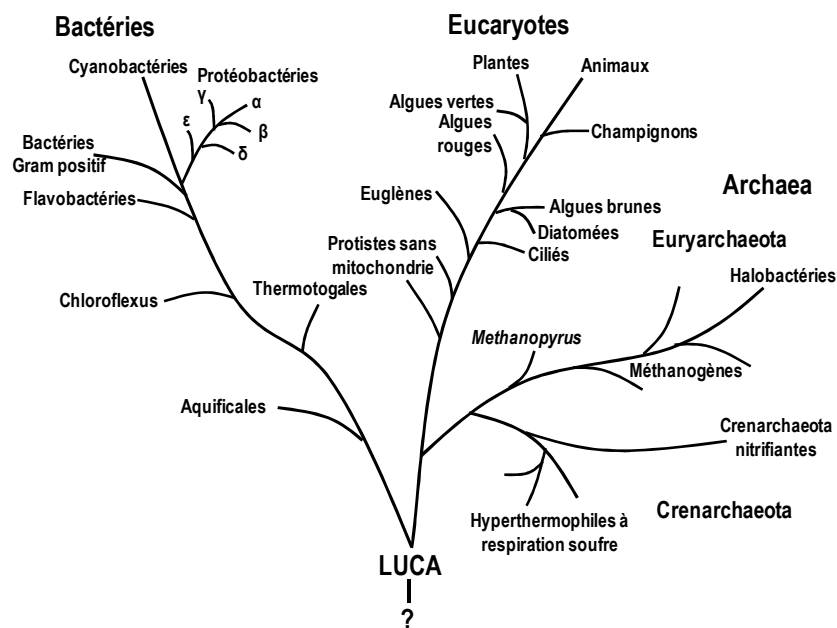


Figure I.3. Arbre de la vie fondé sur une phylogénie résultant de la comparaison des séquences de gènes fondamentaux pour le processus vivant, en particulier les gènes codant pour les ARN des ribosomes. *Source : Gobat, 2010.*

I.3.1. La faune

La faune du sol comprend un groupe diversifié d'organismes mesurant de quelques micromètres (protozoaires) à plusieurs centimètres (escargots terrestres). Elle est principalement composée d'invertébrés (Linden et al., 1994). Elle peut être divisée en quatre catégories selon la taille des organismes : la microfaune, la mésofaune, la macrofaune et la mégafaune (Figure I.4) (Gobat, 2010; Linden et al., 1994). La microfaune est constituée de protozoaires (organismes unicellulaires, longueur < 0,2 mm), dont les amibes, les flagellés et les ciliés, mais également les rotifères et les tardigrades. La mésofaune comprend des organismes dont la longueur varie de 0,2 à 4 mm : les nématodes, les acariens, les collemboles

mais aussi les protozoaires, les diploures et les microarthropodes. La macrofaune est quand à elle constituée d'animaux dont la taille varie entre 4 et 80 mm. Les principaux organismes retrouvés sont les annélides oligochètes, les mollusques gastéropodes, les macroarthropodes et les insectes. Enfin, la mégafaune contient des animaux vertébrés ayant une longueur supérieure à 80 mm et qui agissent sur la structure du sol de par la formation de galeries. Ces organismes impactent donc le sol par la formation de galeries (aération et drainage du sol), par macrobrassage (mélange des horizons du sol), par fragmentation et microbrassage du sol, par la formation d'agrégats, mais aussi de façon chimique par la décomposition des cadavres et les excréta (Brussaard, 1998).

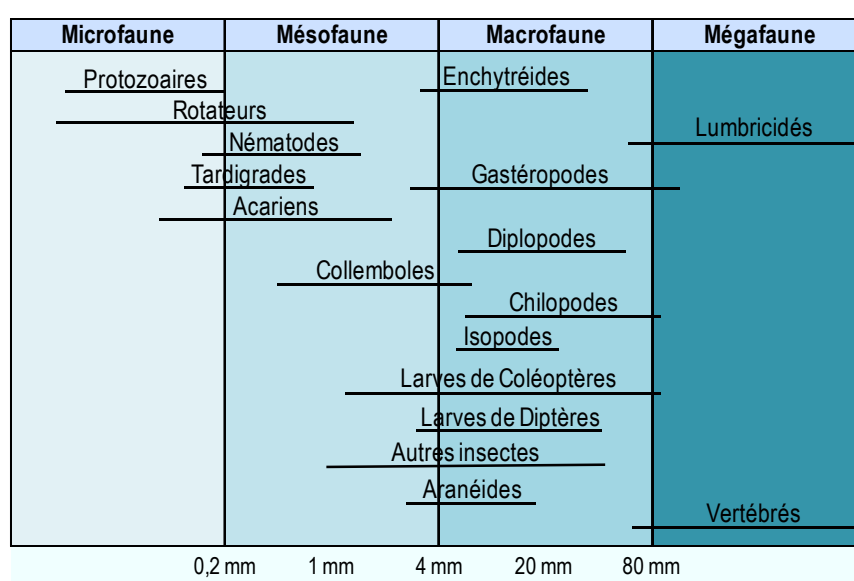


Figure I.4. Tailles respectives des animaux de la microfaune, de la mésofaune, de la macrofaune et de la mégafaune. Source : Gobat, 2010.

I.3.2. La microflore

La microflore peut être définie comme l'ensemble des organismes microscopiques dont l'observation directe ne fournit que peu d'information sur leur identité et leur fonction. Elle est composée d'algues, de bactéries et de champignons. Les algues sont divisées en trois groupes taxonomiques : les algues vertes (Chlorophycées), les algues jaunes-vertes (Xanthophycées) et les diatomées (Bacillariophycées) (Gobat, 2010). Les principaux attributs fonctionnels des algues des sols incluent la production primaire, la fixation du N_2 , et la stabilisation des agrégats du sol par la production des polysaccharides liant les particules solides du sol. Les sols sont souvent composés de 10^3 à 10^4 algues par gramme (Metting, 1981). Les microorganismes (bactéries et champignons), seront présentés plus précisément dans la partie II de cette synthèse bibliographique.

I.3.3. La flore végétale

Les plantes jouent un rôle important dans le compartiment « sol » puisqu'elle intervient aussi bien en profondeur par les racines qu'en surface avec les organes aériens. Les plantes influencent le sol par des échanges permanents d'eau et de substances par sécrétion et excrétion au niveau de la rhizosphère (Gobat, 2010; De Deyn et al., 2010). En effet les racines excrètent dans le sol des substances telles que des sucres, des acides aminés, des acides organiques, des polysaccharides, des vitamines ou encore des enzymes, créant des environnements uniques pour les micro-organismes qui vivent dans la rhizosphère (Garbeva et al., 2004). Les racines peuvent servir d'habitats à des microorganismes (champignons mycorhiziens, bactéries formant des nodosités), permettent également une structuration du sol, mais elles peuvent également jouer un rôle dans la dépollution des sols de par la phytoremédiation (Wong, 2003; Vangronsveld et al., 2009; Gómez-Sagasti et al., 2012). C'est donc un compartiment à ne pas négliger pour l'étude du fonctionnement et de la qualité du sol.

II. Les communautés microbiennes du sol

Les microorganismes peuvent être définis comme des organismes vivants invisibles à l'œil nu. Ces différentes formes de vie auraient été les premières à se développer sur Terre il y a environ 3,5 milliards d'années. Il est possible de séparer les microorganismes telluriques en deux groupes : les procaryotes et les eucaryotes :

- Les procaryotes sont des microorganismes dont la cellule ne possède pas de noyau cellulaire ni d'autres organites (Rosenberg et al., 2014; Paul, 2014). Ils sont composés notamment des bactéries et des archées. Les bactéries sont ubiquistes, elles peuvent se retrouver dans des environnements très communs comme les sols, mais elles peuvent également être rencontrées dans des environnements extrêmes tels que les milieux salés (bactéries halophiles) (Kamekura, 1998; Kivistö & Karp, 2011), les milieux froids (bactéries psychrophiles) (Morita, 1975; Russell & Fukunaga, 1990) et les milieux chauds (bactéries thermophiles) (Zeikus, 1979; Russell & Fukunaga, 1990). Les archées sont des espèces principalement anaérobies divisées en quatre grands groupes sur la base de critères métaboliques : les méthanogènes, les halophiles, les thermophiles et les sulfo-dépendantes. Il est possible de les retrouver aussi bien dans des environnements extrêmes (Demergasso et al., 2004; Nicol et al., 2006; Soule et al., 2009), mais également dans des environnements plus

communs comme les sols (Leininger et al., 2006; Oline et al., 2006; Buckley et al., 1998; Gattinger et al., 2007).

- Les eucaryotes sont quant à eux des organismes présentant un noyau cellulaire et d'autres organites. Ils sont composés des champignons, des levures, des algues et des protozoaires (Adl et al., 2012; Embley & Williams, 2015; Gladieux et al., 2014). Les champignons sont des organismes ubiquistes, ils peuvent être retrouvés aussi bien au niveau du sol que sur les plantes, les débris végétaux (Allen et al., 2003; Eichlerová et al., 2015).

Les microorganismes sont les organismes les plus abondants et diversifiés du sol. En effet, plusieurs milliards de bactéries peuvent être retrouvées dans un gramme de sol. Curtis & Sloan (2005) ont montré la présence d'environ 10^4 à 10^6 espèces bactériennes par gramme de sol. Un gramme de sol peut également contenir plus d'un million de champignons et le réseau mycélien formé peut atteindre jusqu'à 200 m (Killham, 1994; Bardgett, 2005). L'abondance microbienne tellurique varie fortement en fonction du mode d'usage du sol, des nutriments, de son pH et de sa texture (Strickland & Rousk, 2010; Yao et al., 2000; Garbeva et al., 2004). Elle donne une information importante sur le fonctionnement biologique du sol puisqu'elle est fortement liée à l'intensité des flux de carbone et d'azote (Colman & Schimel, 2013). Au-delà de la biomasse, la diversité microbienne du sol est également un paramètre important pouvant déterminer le fonctionnement biologique du sol. Des travaux ont en effet montré que la performance, mais aussi la stabilité (résistance-résilience) d'un écosystème augmentent avec l'augmentation de la biodiversité des communautés qu'il abrite (Garbeva et al., 2004; Torsvik & Øvreås, 2002; Tardy et al., 2014). A l'inverse, une perte de diversité entraîne une perte de résistance et de résilience aux activités anthropiques mais aussi aux stress naturels (Garbeva et al., 2004; van Elsas et al., 2002).

II.1. Implication des microorganismes dans le fonctionnement du sol

Les microorganismes sont impliqués de façon très importante dans le fonctionnement biologique du sol notamment par leur implication dans les services écosystémiques fournis par le sol. En effet ils occupent un rôle important dans les services de support en ce qui concerne le recyclage des nutriments, la production primaire (par la formation de symbioses), ou encore dans la structuration du sol. Ils occupent également un rôle important dans les services de régulation en termes de régulation des maladies, mais aussi par leur capacité à réguler les gaz à effet de serre et à dépolluer les sols contaminés.

- La structuration du sol

Les bactéries et les champignons participent à la structuration du sol. Ils ont cependant des rôles différents en termes de structuration et ne se retrouvent pas dans les mêmes compartiments du sol. Les bactéries permettent la formation de micro-agrégats par la sécrétion de substances polymériques extracellulaires telles que des exopolysaccharides, des polypeptides et d'autres composés plus complexes (Roberson et al., 1995; Ashraf et al., 2013; Six et al., 2002). Les champignons, quant à eux, vont structurer l'habitat sol par leur présence dans les macro-agrégats et par l'action stabilisatrice de leur réseau mycélien, liant entre eux les micro-agrégats formés par les bactéries (Figure I.5) (Tang et al., 2011; Rillig & Mummey, 2006).

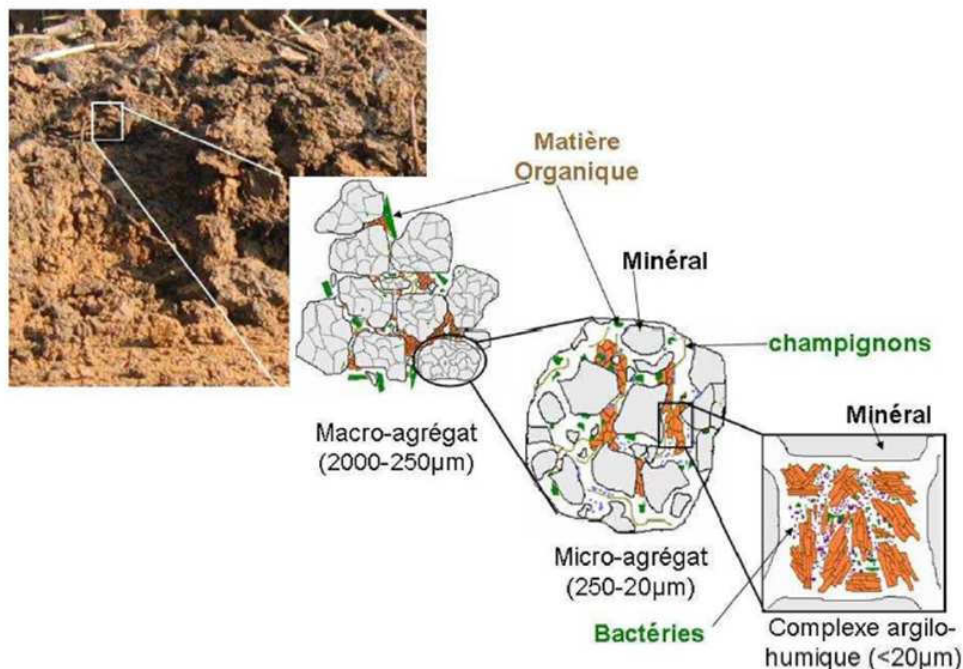


Figure I.5. Schéma de l'agrégation hiérarchique du sol. Source : thèse F.Constancias, 2014.

- Le recyclage des nutriments

Les microorganismes varient par leurs sources énergétiques et leurs stratégies adaptatives. En effet MacArthur & Wilson ont décrit en 1967 deux stratégies démographiques adaptatives, *r* et *K*, afin de comprendre les aptitudes de développement des organismes. En effet les microorganismes considérés comme stratégies *r* présentent un développement et une reproduction très rapides, une bonne capacité de dispersion ce qui leur permet de coloniser des milieux nouveaux et perturbés. On les retrouve donc fréquemment dans les milieux « jeunes » très riches en nutriments. Les stratégies *K* quant à eux survivent grâce à leurs

aptitudes compétitives qui leur permettent de survivre dans des niches plus spécialisées. Leur développement est lent et dépend de la capacité du milieu. Ils sont retrouvés dans des milieux évolués, stables, limités en nutriments.

Tous les microorganismes ne sont donc pas aussi efficaces pour recycler la matière organique des sols, mais ils restent cependant à la base de la régulation des cycles biogéochimiques (*i.e.* carbone, azote, phosphore, soufre) qui sont les processus de transformation cyclique d'un élément ou d'un composé chimique entre les sols, les eaux et l'atmosphère (Paul, 2014). En effet, certaines bactéries sont capables de dégrader des substances insolubles d'origine végétale comme la cellulose, la lignine, de réduire les sulfates, d'oxyder le soufre, de fixer l'azote atmosphérique et de produire des nitrates (Schwarz, 2001; Béguin & Aubert, 1994; Zimmermann, 1990; Tuomela et al., 2000; Friedrich et al., 2005; Cleveland et al., 1999). Les *archaea* sont également impliquées dans les cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote et du soufre (Leininger et al., 2006; Oline et al., 2006; Buckley et al., 1998; Gattinger et al., 2007). Certains champignons saprotrophes se nourrissent en décomposant la matière végétale morte (Eichlerová et al., 2015), ce qui permet une nouvelle fois le recyclage de la matière organique végétale en matière minérale. De manière générale, les champignons ont tendance à préférer une nourriture riche en carbone comme la cellulose et la lignine (Baldrian & Valášková, 2008; Hammel, 1997), alors que les bactéries préfèrent une nourriture riche en azote, comme les feuilles des plantes (Turbé et al., 2010) et l'implication forte de cette composante microbienne dans la fixation de l'azote atmosphérique, l'ammonification, la nitrification et la dénitrification n'est plus à démontrer (Hayatsu et al., 2008). Les microorganismes, de par leur implication dans le recyclage des nutriments du sol, vont également avoir un impact dans la régulation des gaz à effet de serre (*e.g.* CO₂, CH₄, N₂O, N₂) ce qui est d'une importance majeure étant donné l'augmentation constante de ces gaz dans l'atmosphère (Conrad, 1996; Singh et al., 2010; Smith et al., 2003).

- La production primaire végétale

Les communautés microbiennes, de par la dégradation des déchets animaux et végétaux et le recyclage de ces nutriments, permettent d'apporter des éléments minéraux nécessaires à la croissance des végétaux et donc à la production primaire agricole. De plus certains microorganismes ont la capacité de développer des interactions biotiques et notamment les symbioses avec les plantes tels que les champignons mycorhiziens (Allen et al., 2003; Smith & Read, 2008) et les bactéries PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Rodriguez & Fraga, 1999; Mehnaz & Lazarovits 2006; Kaymak, 2011; van

der Heijden et al., 2006; Cleveland et al., 1999), ce qui permet d'augmenter la mise à disposition d'éléments nutritifs pour leur croissance et permet donc une amélioration de la productivité agricole (Barrios, 2007).

- *La régulation des maladies*

Les microorganismes telluriques occupent un rôle important dans les services de régulation rendus par les sols notamment en termes de maladies. En effet, certaines espèces bactériennes et de champignons peuvent être pathogènes de l'Homme, des animaux et des végétaux (Salmond, 1994; Berg et al., 2005; Bütten & Bonas, 2003; Selosse et al., 2015; Alabouvette et al., 1993; Schmidt *et al.*, 2013; Grandaubert et al., 2013). Cependant certaines espèces peuvent également représenter une barrière de protection contre les maladies ou ces organismes pathogènes (bactéries PGPR, Okon & Labandera-Gonzalez, 1994; champignons mycorhiziens, Verbruggen et al., 2010; Qiu et al., 2012).

- *La dépollution des sols contaminés*

Les microorganismes peuvent permettre de dépolluer les sols contaminés par des métaux lourds (http://www.brgm.fr/sites/default/files/enjeux_geosciences_16.pdf; Mougin et al., 1996; Battaglia-Brunet et al., 2006) ou des composés organiques tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les pesticides (Bouchez et al., 1996; Martin-Laurent et al., 2004; Mougin et al., 1994; Mougin et al., 2003; Merlin et al., 2014). Cette capacité à dépolluer rentre dans le processus de bioremédiation qui désigne un ensemble de techniques utilisées pour dépolluer un site naturel en faisant appels à des organismes tels que les végétaux et les microorganismes et respectant l'environnement et la santé humaine (http://pierre-armand-roger.fr/publications/pdf/198_bioremed.pdf). Garbisu & Alkorta (1999) définissent la bioremédiation comme un processus par lequel les organismes vivants dégradent ou transforment les contaminants organiques dangereux en composés inorganiques comme le CO₂, l'H₂O, et le NO₃. C'est le cas de la dégradation de certains HAP dont l'étude est en plein développement en raison de leur génotoxicité et leur présence persistante dans de nombreux sites industriels abandonnés. Les organismes dégradants sont essentiellement les bactéries et les champignons. Les bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium* spp., *Rhodococcus* spp., et les champignons lignolytiques tels que *Phanerochaete chrysosporium*, *Bjerkandera adusta*, et *Pleurotus ostreatus* attaquent les HAP par cométabolisme (Haritash & Kaushik, 2009; Bouchez et al., 1996). De nombreuses

biodégradations, pour être effectives, nécessitent l'action conjuguée de plusieurs microorganismes. C'est notamment le cas pour la dégradation de l'Atrazine, substance qui présente un effet herbicide (Martin-Laurent et al., 2004). Les symbioses sont également très importantes dans ces processus de dépollution (*e.g.* bactéries PGPR, champignons mycorhiziens) (De Maria et al., 2011; Allen et al., 2003). Dans certains cas la décontamination est spontanée, dans d'autres cas une inoculation avec des souches spécialisées est nécessaire afin d'augmenter la biodégradation ou la biotransformation des polluants. Toutefois, dans la plupart des cas ce sont quand même les organismes indigènes, déjà présents dans les sols contaminés, qui sont les plus adaptés à la décontamination (Bouchez et al., 1996).

Les microorganismes sont très impactés par les pollutions chimiques, certains vont disparaître alors que d'autres présentant des mécanismes de résistance peuvent proliférer (Del Val et al., 1999; Giller et al., 2009; Gómez-Sagasti et al., 2012). Le même schéma est observé concernant les communautés microbiennes impactées par les pollutions métalliques par les Eléments Traces Métalliques (ETM) (Ranjard et al., 2006; Giller et al., 1998; Nannipieri et al., 2003; Kandeler et al., 1996). De par leur plasticité métabolique, certains microorganismes telluriques permettent une phytostabilisation des polluants par association avec des plantes (Epelde et al., 2014; Gadd, 2010). D'autres interviennent dans la dégradation et l'immobilisation de ces polluants, soit par association avec une plante hyperaccumulatrice (champignons mycorhiziens et bactéries endophytes) (Miransari, 2011; Rajkumar et al., 2009), soit par accumulation et biosorption (Brandl & Faramarzi, 2006; Gadd, 2010; Nakajima & Sakaguchi, 1986; Mulaba-Bafubandi et al., 2009). Cette amélioration du statut du sol est d'une importance primaire car en plus d'affecter défavorablement la croissance des plantes, les métaux lourds ont des effets défavorables sur l'environnement, affectant la santé de l'écosystème et la chaîne alimentaire humaine.

II.2. Outils de caractérisation des communautés microbiennes

Accéder aux différentes composantes des communautés microbiennes est un enjeu majeur dans les études d'écologie microbienne afin de comprendre l'implication des microorganismes dans les processus à la base des services rendus par les sols. La caractérisation des communautés microbiennes présentent toutefois de nombreuses difficultés de par leur immense diversité génétique et métabolique (Torsvik & Øvreås 2002; Roesch et al., 2007), mais aussi de par la forte hétérogénéité du sol rendant difficile l'accès à ces

organismes (Ranjard et al., 2003; Maron et al., 2011). Une importante quantité de méthodes ont été mises au point pour décrire les microorganismes telluriques. Certaines sont dites « classiques » et désignent des outils de microbiologie pasteurienne basés sur la culture et l'observation des organismes. Ces techniques ne sont toutefois pas représentatives de l'ensemble des communautés microbiennes puisqu'environ 90% des microorganismes ne sont pas cultivables (Nannipieri et al., 2003; Hugenholtz et al., 1998). D'autres approches plus récentes relèvent de la biologie moléculaire et sont basées sur l'extraction et la caractérisation de l'ADN directement à partir d'environnements naturels. Ces méthodes d'analyse ont permis de caractériser l'abondance et la diversité des communautés microbiennes des sols (Ranjard et al., 2000; Maron et al., 2007) dans de nombreux milieux naturels ou anthropisés et de façon synchronique ou diachronique.

II.2.1. Mesures de la biomasse microbienne des sols

La biomasse microbienne rend compte de l'abondance des microorganismes du sol. Afin de l'estimer, la méthode de fumigation-extractions au chloroforme est communément utilisée. Elle consiste à lyser la biomasse microbienne, vivante et morte, au chloroforme libérant ainsi leurs composés organiques sous forme soluble (Vance et al., 1987). La quantité de carbone microbien est alors calculée en retirant la quantité de carbone soluble dosée sans fumigation à celle obtenue avec fumigation (norme ISO 14240-2). Cependant cette technique est difficile à mettre en œuvre, elle n'est donc pas adaptée pour l'étude d'échantillonnages de grande ampleur.

L'abondance des communautés microbiennes du sol peut également être estimée par la quantification de l'ADN extrait de l'échantillon environnemental. Cette technique mesure l'ADN global du sol et montre une forte corrélation avec la biomasse mesurée classiquement par la technique de fumigation-extraction (Marstorp et al., 2000; Leckie et al., 2004). De nombreux kits d'extraction d'ADN ont été développés au cours des deux dernières décennies et de nombreux protocoles maison ont également été mis en place. Une procédure d'extraction d'ADN a même été normalisée afin de permettre aux différentes analyses d'être comparées entre elles. Il s'agit de la norme ISO-11063 (Petric et al., 2011). Une amélioration de cette norme a été proposée par Terrat et al. (2012) et Plassart et al. (2012). Les ADN extraits sont ensuite déposés sur gel et quantifiés grâce à un logiciel d'analyse. Cette méthode est plus facilement applicable pour l'analyse d'un grand jeu d'échantillons. En effet, Dequiedt et al. (2011) ont déterminé l'abondance microbienne de 2150 sols prélevés sur l'ensemble du territoire français. L'estimation de la biomasse moléculaire microbienne reste cependant très

globale puisqu'elle prend en compte l'ensemble des microorganismes (*i.e.* bactéries, champignons, virus) et ne permet pas de faire la différence entre ceux vivants ou morts.

II.2.2. Mesures de la diversité taxonomique des communautés microbiennes

La diversité des communautés microbiennes peut être caractérisée en termes de structure, de richesse, d'équitabilité ou de composition taxonomique par différentes approches moléculaires. La structure génétique des communautés microbiennes est classiquement déterminée par des techniques de génotypages dites « d'empreinte moléculaire ». Elles sont basées sur l'analyse du polymorphisme de taille ou de composition de séquences d'ADN et fournissent des informations concernant les changements de structure des communautés microbiennes. Ces techniques, comme la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Nakatsu, 2007), la TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis), la T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, Thies, 2007) ou encore la RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, Ranjard et al., 2000) permettent d'obtenir des informations sur la structure et la composition des communautés microbiennes et peuvent être utilisées pour comparer plusieurs échantillons de sol (Torsvik & Ørveås, 2002). Ces techniques ont été beaucoup utilisées pour évaluer l'impact de perturbations sur les communautés microbiennes comme les pollutions métalliques (Ranjard et al., 2006; Bressan et al., 2008) et chimiques (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), antibiotiques, pesticides) (Girvan et al., 2004; Crouzet et al., 2010) de par leur rapidité, leur reproductibilité. De plus elles sont peu coûteuses et permettent d'analyser en routine un grand nombre d'échantillons. Elles ne renseignent cependant que peu sur la composition taxonomique des communautés et sur la richesse spécifique en termes de nombre de taxons.

Depuis plusieurs années, une analyse plus fine de l'inventaire et de la diversité taxonomique communautés microbiennes du sol peut être déterminée grâce au développement des techniques de séquençage massif « nouvelle génération » (séquençage à très haut-débit, Roche 454 Sequencing System, Illumina). Par exemple, la technique de pyroséquençage par la technologie 454 permet d'obtenir rapidement un nombre de séquences s'élevant à plusieurs millions pour chaque échantillon de sol analysé (Figure I.6). Les séquences d'ADN obtenues sont ensuite analysées par des techniques bioinformatiques et comparées entre elles sur la base de la similarité de leurs séquences, mais aussi contre des bases de données de séquences d'organismes connus (*i.e.*, RDP[®], greengenes[®], Silva[®]). Il est donc possible de déterminer (i) l'identité des microorganismes présents correspondant après

comparaison avec une base de données, et (ii) calculer des indices de diversité de ces communautés (*i.e.* Shannon, richesse, équitabilité) (Terrat et al., 2012). Actuellement, elle représente la méthode la plus puissante pour quantifier précisément et caractériser la diversité microbienne dans des environnements complexes (Roesch et al., 2007; Fulthorpe et al., 2008), soit en ciblant un gène taxonomique (*i.e.* gènes ribosomiques, Terrat et al., 2012), soit en ciblant un gène fonctionnelle (*i.e.* gène *nosZ* pour le suivi des communautés bactériennes dénitrifiantes, Philippot et al., 2013). Cette approche de métagénomique a été utilisée pour caractériser la diversité microbienne dans des sols variant par leur mode d'occupation (forêt, prairie, culture) (Nacke et al., 2011; Shange et al., 2012; Lienhard et al., 2013), ou encore par leurs propriétés physicochimiques (Lauber et al., 2009; Rousk et al., 2010). Elle présente toutefois des biais liés aux différentes étapes techniques telles que l'amplification PCR (diversité artificiellement générée par l'ADN polymérase (erreurs dans les séquences), amplification préférentielle de certaines séquences modifiant leur représentativité en fin de réaction), les erreurs de séquençage liées à la détection du signal lumineux consécutif à l'ajout des nucléotides. Afin de limiter les conséquences de ces types d'erreurs sur l'estimation de la diversité microbienne, les séquences obtenues sont généralement filtrées en éliminant les séquences trop courtes et de mauvaise qualité. Le traitement des données de séquençage générées nécessite une importante puissance de calcul et de capacité de stockage. Ainsi, des pipelines d'analyses ont été développés permettant de tirer des données exploitables à partir de jeux de séquences brutes (*i.e.* *GnS-Pipe*, Terrat et al., 2012). Les analyses sont toutefois longues et nécessitent des connaissances approfondies en bioinformatique et plusieurs jours d'analyse.

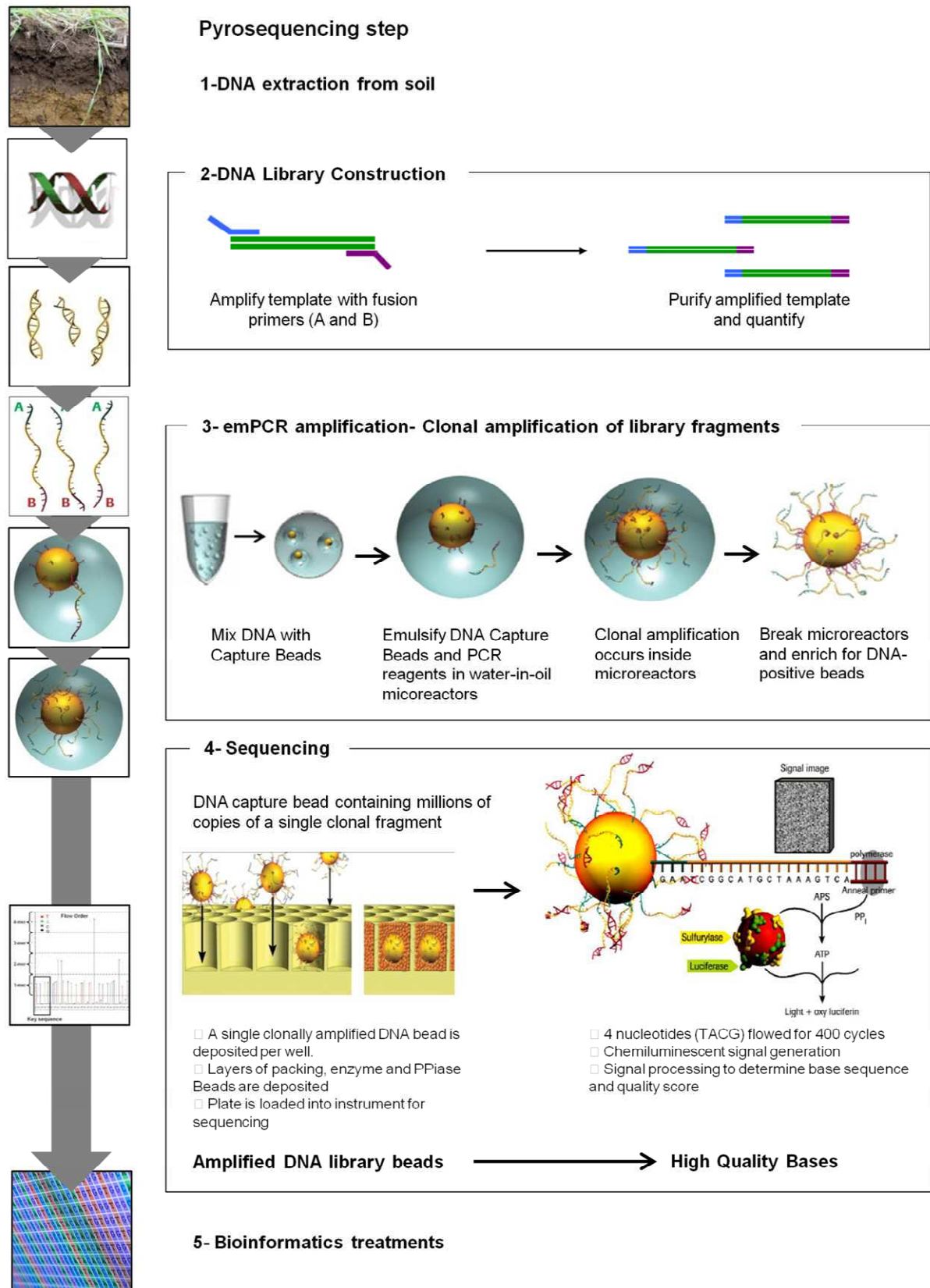


Figure I.6. Schéma présentant les différentes étapes de la technique du pyroséquençage (selon Roche®) dans le cadre de l'analyse d'un échantillon de sol. *Source : <http://454.com/products/technology.asp>*

III. Outils de diagnostic de la qualité biologique des sols : les bioindicateurs

Le sol abrite une importante biodiversité en termes d'abondance, de diversité et d'activité fonctionnelle. Comme décrit précédemment pour les communautés microbiennes, les organismes du sol et leurs interactions sont essentielles de par leur implication dans de nombreux processus à l'origine de services écosystémiques comme la décomposition de la matière organique, le recyclage des nutriments, la structuration du sol et la restauration de sols contaminés. Les organismes telluriques sont donc impliqués dans la capacité du sol à soutenir le bien-être humain (Mace et al., 2012). Une meilleure compréhension des organismes du sol paraît donc essentielle pour guider les modes de gestion des sols et conserver leur biodiversité, permettant ainsi le maintien des services écosystémiques. La Convention sur la Diversité Biologique (CBD, <http://www.cbd.int/>) a mis en évidence l'importance de développer des indicateurs biologiques pour permettre de suivre l'évolution de la biodiversité dans un contexte où l'intensification des pratiques agricoles à des fins de rendement a mené à une perte de biodiversité des agrosystèmes.

III.1. La bioindication, une méthode de diagnostic efficace

La bioindication correspond à la capacité de certains organismes à refléter par leur présence ou absence et leur comportement démographique, l'évolution d'un milieu et de ces caractéristiques (Blandin, 1986). Un bioindicateur peut donc être défini comme un organisme (ou une partie d'organisme ou une communauté) permettant de suivre l'évolution de la biodiversité, l'état des ressources naturelles des sols, de détecter les évolutions précoces et d'évaluer les risques pour l'écosystème (Markert, 2007; Bispo et al., 2009; Pulleman et al., 2012; Li et al., 2010). Les bioindicateurs sont des substituts mesurables pour décrire des changements environnementaux eux-mêmes trop complexes à évaluer (Nielsen et al., 2002).

Plusieurs critères sont pris en compte afin de sélectionner les bioindicateurs des sols. Ils doivent être connus scientifiquement (leur biologie et leur écologie doivent être maîtrisées), être sensibles, présenter une corrélation forte avec les fonctions bénéfiques du sol, utiles pour comprendre les processus des écosystèmes, compréhensibles et utiles aux gestionnaires des sols, faciles et peu coûteux à mesurer (Pulleman et al., 2012; Doran & Zeiss, 2000; Bispo et al., 2009; Turbé et al., 2010; Cortet et al., 1999; Ritz et al., 2009). Les méthodes d'analyses doivent être au maximum standardisées voir normalisées, avoir une grande applicabilité, une forte reproductibilité, et être évaluées statistiquement. Cependant, identifier des méthodes communes internationalement reste un des plus grands défis de la science du sol. En effet, il

existe une grande diversité d'indicateurs pour la surveillance des sols (Ritz et al., 2009) mais seulement quelques-uns ont été utilisés dans des suivis de grandes envergures, aux échelles nationale (programme ADEME « Bioindicateurs de qualité des sols », Bispo et al., 2009) et internationale (projet Ecofinders, Pulleman et al., 2012). Cette faible proportion utilisée peut être expliquée par le manque de certitude concernant leur fiabilité aux différentes échelles spatiales et temporelles et par un manque de référentiels d'interprétation. Ces référentiels permettraient de déterminer de façon fiable si les réponses des organismes mesurées dans des contextes particuliers se retrouvent dans d'autres situations, d'effectuer un diagnostic de la qualité des écosystèmes afin de conduire à l'établissement de stratégies à long terme et d'implémenter une meilleure gestion des pratiques (Turco et al., 1994).

III.2. Les bioindicateurs d'impact et d'accumulation

De nombreux travaux ont défini le terme bioindicateur et certaines études ont effectué leur classification en deux catégories : les bioindicateurs d'impact (ou d'effet) et les bioindicateurs d'accumulation (Markert, 2007; Bispo et al., 2009) (Figure I.7). Les bioindicateurs d'accumulation (écotoxicologiques) comprennent des organismes (ou partie, ou communauté) qui présentent la capacité d'accumuler une ou plusieurs substances issues de leur environnement (*i.e.* épandages de déchets, pratiques agricoles). Ils permettent donc de renseigner sur le niveau d'exposition des communautés à des substances comme les pesticides, les métaux lourds. Certains cloportes et diplopodes, les collembolles, les vers de terre mais surtout les gastéropodes sont des organismes bioaccumulateurs (Cortet et al., 1999; Turbé et al., 2010). D'innombrables substances sont actuellement piégées dans les sols. La bioindication par ces organismes bioaccumulateurs permettraient de mettre en évidence de façon précoce et peu coûteuse les problèmes de contamination des sols. Les bioindicateurs d'impact sont quant à eux des organismes (ou partie ou communauté) qui ne peuvent pas accumuler de substances provenant de leur environnement mais qui présentent des réponses spécifiques à leur exposition ou à des stress d'origines anthropiques ou naturels (*i.e.* changement mode d'usage du sol, compaction, qualité de la matière organique). Les réponses observées peuvent être de simples modifications génétiques, morphologiques, métaboliques, de comportement, mais également présenter une modification complète de la structure des communautés des différents écosystèmes (Cortet et al., 1999; Bispo et al., 2009).

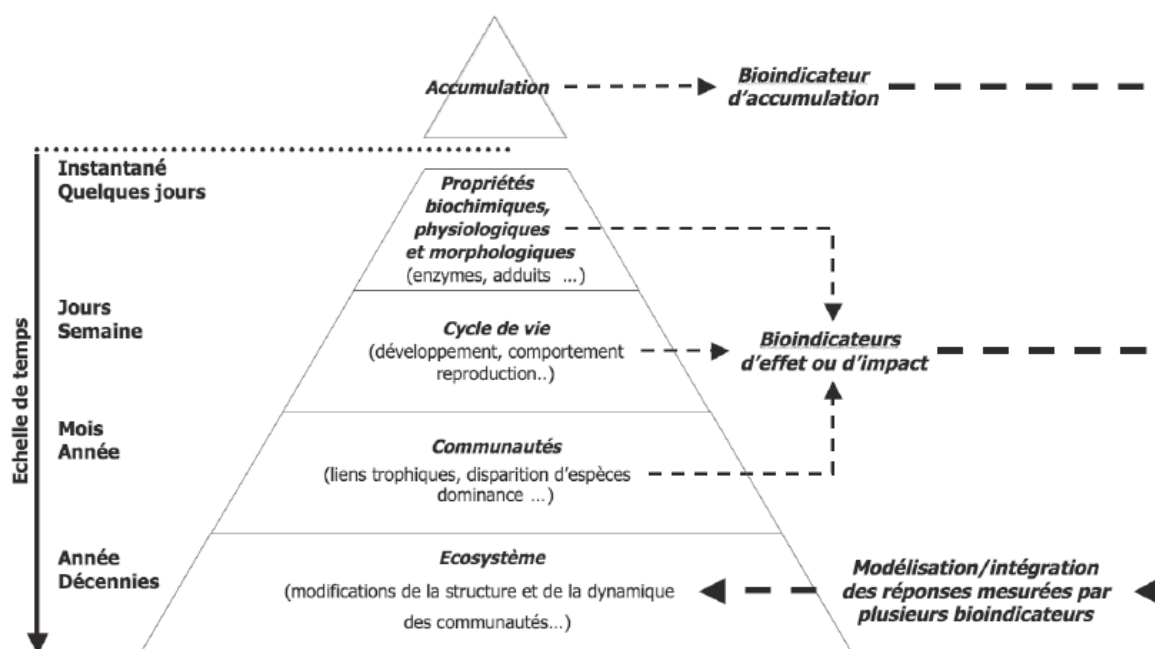


Figure I.7. Les différents niveaux de réponse des bioindicateurs. *Source : Bispo et al., 2009.*

III.3. Les différents acteurs de la bioindication

Les travaux disponibles dans la littérature montrent différents groupes d'organismes telluriques peuvent être utilisés pour développer des bioindicateurs, que ce soient (i) la macrofaune telle que les vers de terre et les escargots (ingénieurs de l'écosystème), (ii) la mésofaune telle que les nématodes, les collemboles, les acariens (régulateurs biologiques qui agissent comme des herbivores ou comme prédateurs d'autres invertébrés ou des microorganismes) ou (iii) les microorganismes du sol (ingénieurs chimiques, décomposeurs et transformateurs de la matière organique) (Pulleman et al., 2012; Doran & Zeiss, 2000; Bispo et al., 2009; Turbé et al., 2010; Cortet et al., 1999; Ritz et al., 2009). La flore peut également servir d'indicateur de la qualité des sols.

III.3.1. Bioindication par la flore végétale

La flore végétale joue un rôle important dans sol par le développement d'un réseau racinaire. Ces racines permettent la structuration du sol (Oades, 1993) mais elles peuvent également jouer un rôle dans la dépollution des sols par phytoremédiation (Gómez-Sagasti et al., 2012) et la libération d'exsudats racinaires va favoriser préférentiellement le développement de certains organismes du sol. C'est donc un compartiment à ne pas négliger pour la compréhension du fonctionnement du sol et de sa qualité. De nombreux indicateurs peuvent être utilisés pour étudier la flore, mais quelques uns sont fortement recommandés.

Remon et al. (2009) proposent d'étudier les associations végétales de la flore spontanée présente sur les différents sites à étudier comme premier bioindicateur de la qualité des sols (*i.e.* espèces dominantes, espèces accumulatrices ou tolérantes, adaptation d'espèces) liées aux conditions de milieux et aux paramètres abiotiques des sols (*i.e.* contaminants, pH, carbonates). Ils proposent également de mesurer la bioaccumulation des éléments traces dans les racines mais aussi dans les autres organes de la plante notamment les parties foliaires. L'identification des exsudats racinaires relargués dans le sol par la plante est également un indicateur de la qualité des sols de par son importance pour le développement microbien (http://www.andra.fr/ope/index.php?option=com_content&view=article&id=45:bioindicateurs-du-sol&catid=47:biodiversite&Itemid=185&lang=fr).

III.3.2. Bioindication par les ingénieurs de l'écosystème

La macrofaune comprend des organismes qualifiés d'ingénieurs de l'écosystème. C'est le cas des vers de terre. Les vers de terre sont considérés comme des ingénieurs de l'écosystème par leur rôle dans la structuration du sol et la formation de galeries. Ils jouent également un rôle important concernant la dégradation de la litière et son incorporation en profondeur. Les vers de terre sont de bons bioindicateurs des activités anthropiques car ils réagissent très fortement aux variations de mode d'usage du sol (notamment les épigés et les anéciques qui sont corrélés négativement avec le travail du sol) (Cortet et al., 1999; Blair et al., 1996; Pelosi et al., 2015). Ils sont également sensibles aux polluants et peuvent servir de bioindicateurs dans la détection de contaminants. La bioindication par ces communautés s'effectue par l'étude de leur biomasse et de la diversité des groupes fonctionnels (Pulleman et al., 2012; Turbé et al., 2010; Pérès et al., 2011). Les escargots de l'espèce *Cantareus aspersus* peuvent quant à eux servir d'indicateurs sur la biodisponibilité des polluants et notamment les polluants métalliques en mesurant la concentration des métaux lourds accumulée par l'organisme (norme ISO 15952) (<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00670360/document>; Pauget, 2012).

III.3.3. Bioindication par les régulateurs biologiques de l'écosystème

La mésofaune comprend de petits invertébrés impliqués directement dans les services écosystémiques rendus par le sol (Lavelle et al., 2006) et considérés comme des régulateurs biologiques puisqu'ils sont notamment impliqués dans la dégradation de la matière organique fraîche (invertébrés détritivores, Hedde et al., 2007; Blakely et al., 2002) et dans la prédation d'autres invertébrés et/ou des microorganismes (Griffiths & Caul, 1993). Cortet et al. (1999)

et Ritz et al. (2009) ont déterminé ces organismes comme étant de bons indicateurs de la qualité des sols de par leur sensibilité aux pressions environnementales. Ils peuvent aussi bien servir de bioindicateurs de contamination que de bioindicateurs d'impacts écologiques et/ou toxicologiques (Tableau I.1).

Tableau I.1. Utilisation de différents bioindicateurs. o: pas d'étude disponible; +: utilisation possible; -: utilisation déconseillée. *Source : Cortet et al., 1999.*

	Indicateurs	Vers de terre	Gastéropodes	Acariens	Isopodes	Collemboles	Nématodes
Indicateurs d'impact "écologiques"	Abondance	++	++	++	++	++	++
	Richesse	++	++	++	++	++	++
	Diversité	++	++	++	++	++	++
Indicateurs d'impact "toxicologiques"	Biomarqueurs d'exposition	++	+	o	++	+	o
	Perturbations neurologiques	++	o	o	o	o	o
	Mortalité	++	-	+	-	+	+
	Reproduction	++	++	++	+	++	+
	Fonction	++	o	+	o	+	o
Indicateurs de bioaccumulation		++	++	o	++	+	o

Hedde et al. (2012) ont utilisé les géophages et les invertébrés à corps mous pour informer de l'exposition (par ingestion ou de contact) à des métaux lourds à partir de sols irrigués pendant une centaine d'années avec des eaux usées. Les collemboles peuvent aussi servir d'indicateurs du changement de mode d'usage des sols. En effet Chauvat et al. (2014) ont utilisé les collemboles pour suivre l'impact de la plantation de cultures pérennes comparées à une culture annuelle. Les nématodes, en raison de leur contact direct avec les particules du sol (Blakely et al., 2002) peuvent servir de bons indicateurs concernant la contamination des sols (Schloter et al., 2003). Ils permettent également de renseigner sur l'impact du travail du sol puisque leur développement est fortement lié à la porosité du sol, à l'agrégation des particules et de la rétention de l'eau (Turbé et al., 2010). Les descripteurs retenus pour étudier les nématodes sont leur structure communautaire et leur diversité taxonomique (Blair et al., 1996; Mulder et al., 2005), ce qui demande des experts qualifiés (Pulleman et al., 2012); mais aussi simplement le nombre total et l'abondance des différents groupes fonctionnels (*i.e.* bactérivores, fongivores, phytoparasites, parasites animaux). Le séquençage massif permet actuellement de caractériser la structure des communautés de nématodes sans avoir recours aux experts et à haut débit (Donn et al., 2008; Ritz et al., 2009).

III.3.4. Bioindication par les ingénieurs chimiques de l'écosystème

La diversité des microorganismes dans les agrosystèmes est immense et essentielle au maintien d'une « bonne » qualité du sol de par leur implication dans de nombreux services rendus par les sols comme la décomposition de la matière organique, la minéralisation du

carbone et de l'azote, la dégradation des polluants, la lutte contre des pathogènes et la structuration du sol (Sharma et al., 2010). Les communautés microbiennes sont aussi très sensibles aux variations de l'environnement et répondent très rapidement à ces variations en raison de leur temps de génération court (Schloter et al., 2003; Sharma et al., 2010). En effet, la caractérisation des communautés microbiennes mettent souvent en évidence des modifications de taille, de structure et de fonctionnement des communautés lors de changement de mode d'usage des sols (Bending et al., 2004; Nielsen et al., 2002; Gros et al., 2004). Les microorganismes sont donc de très bons bioindicateurs de la qualité du sol (Ranjard et al., 2010; Schloter et al., 2003).

Les bioindicateurs microbiens utilisés pour diagnostiquer la qualité du sol peuvent être quantitatifs (*i.e.* la biomasse moléculaire microbienne, les densités bactériennes et de champignons), qualitatifs (*i.e.* la structure des communautés par empreinte moléculaire, la diversité taxonomique par séquençage haut débit) et fonctionnels (*i.e.* les activités enzymatiques, la quantification de flux de CO₂ et N₂O) (Griffiths et al., 2001; Bending et al., 2004; Riah et al., 2014; Guénon et al., 2013). Dans cette partie, seuls quelques bioindicateurs microbiens quantitatifs et qualitatifs seront présentés.

III.3.4.1. Bioindicateurs microbiens quantitatifs

- *La biomasse microbienne*

La biomasse microbienne est composée d'organismes vivants et morts. Elle est utilisée pour estimer l'état biologique des sols de par sa corrélation avec la quantité de matière organique du sol. En effet Zhou & Ding (2007) ont montré que la biomasse microbienne était corrélée au carbone organique du sol. D'autres études ont montré une relation étroite entre la biomasse microbienne, la vitesse de décomposition de la matière organique et la minéralisation de l'azote (Jenkinson, 1988; Carter et al., 1999). De plus, la biomasse microbienne est sensible à la gestion des modes d'usage des sols et de leur pollution (Schloter et al., 2003). En effet plusieurs études ont montré un impact du travail du sol sur la biomasse microbienne tellurique (Doran et al., 1987; Turbé et al., 2010; Wrigh et al., 2005; Aslam et al., 1999; Lienhard et al., 2013; Constancias et al., 2014; Constancias et al., 2015; Plassart et al., 2012). D'autres études ont mesuré une diminution de la biomasse en présence d'éléments métalliques et de pesticides (Pennanen et al., 1996; Moorman, 1989). La biomasse microbienne du sol peut donc être un bioindicateur du recyclage des nutriments et de la

régulation de la transformation de la matière organique (Gregorich et al., 1994; Turco et al., 1994).

Différentes méthodes sont disponibles pour estimer la taille de la biomasse dont la biomasse moléculaire microbienne décrite précédemment. Cette biomasse moléculaire est obtenue par extraction et quantification de l'ADN des sols, c'est donc un rendement d'ADN rendant compte de l'abondance des microorganismes telluriques (Dequiedt et al., 2011). Dans leur étude, Dequiedt et al. (2011) ont montré que l'intensification du travail du sol (*i.e.* monoculture, viticulture) entraînait une diminution de la biomasse moléculaire microbienne et que les principaux facteurs influençant cette biomasse sont la texture, le pH et le carbone organique des sols.

- La densité des bactéries et des champignons

Les densités des bactéries et des champignons sont des paramètres importants pour décrire la qualité microbiologique d'un sol. En effet, plus ces densités sont importantes, plus le sol est considéré comme fertile. Les densités bactériennes et de champignons sont généralement plus faibles dans les sols sous cultures avec labour par rapport aux sols sous prairies (Constancias et al., 2014). Verbruggen et al. (2010) observent également une diminution de la densité des champignons mycorhiziens sous labour. Ces bioindicateurs de densité sont donc sensibles aux variations de modes d'usage des sols. De plus, le rapport champignons/bactéries qui doit être compris entre 1 et 5%, permet de détecter un éventuel déséquilibre entre ces deux communautés microbiennes qui peut indiquer un déséquilibre dans le fonctionnement biologique du sol comme la minéralisation de la matière organique (Zhou & Ding, 2007).

Différentes méthodes sont disponibles pour mesurer la densité des bactéries et des champignons dont le dosage des PLFA (acides gras phospholipidiques, Frostegård et al., 2011; Zelles, 1999) et la PCR quantitative (qPCR) par amplification de l'ADNr 16S et 18S (densité bactérienne et de champignons, respectivement ; Chemidlin Prévost-Bouré et al., 2011).

III.3.4.2. Bioindicateurs microbiens qualitatifs

Les mesures des communautés par les bioindicateurs quantitatifs restent très globales et ne permettent pas de différencier l'hétérogénéité des populations au sein des communautés. Avec le développement des outils moléculaires en écologie microbienne, il est devenu évident

que seule une faible partie de la diversité du monde microbien est actuellement connue. Des informations plus précises sur la structure et la diversité des communautés microbiennes sont indispensables pour la compréhension de la relation entre les facteurs environnementaux et les fonctions des écosystèmes (Torsvik et al., 1996; Turco et al., 1994). Trois indicateurs peuvent être utilisés afin d'estimer la diversité des communautés bactériennes et de champignons, il s'agit de la structure génétique, des indices de diversité et de la composition taxonomique des communautés.

- La structure des communautés bactériennes et de champignons

Les microorganismes présentent des séquences d'ADN très conservées avec des domaines intergéniques très variables. Des techniques telles que la DGGE (Nakatsu, 2007), la TGGE, la T-RFLP (Thies, 2007) ou encore la RISA (Ranjard et al., 2000) permettent d'obtenir une empreinte génétique des communautés bactériennes ou de champignons, avec des résultats obtenus sous forme de profils de bandes complexes et spécifiques de chaque communauté microbienne (Ranjard et al., 2010). Ces variations d'empreintes génétiques mettent en évidence des changements de structure des communautés microbiennes en réponse à différents modes de gestion des sols. En effet, des changements de structure des communautés microbiennes ont été mesurés après des modifications de pratiques agricoles ou de contamination d'un site (Ovreås & Torsvik, 1998; Fantroussi et al., 1999; Schlöter et al., 2003).

- Les indices de diversité des communautés bactériennes et de champignons

Il existe de nombreux indices pouvant fonctionner comme bioindicateurs et permettant de mesurer la diversité des communautés bactériennes et de champignons (Nannipieri et al., 2003). Ces indices de diversité microbienne peuvent montrer la stabilité des communautés et décrire leurs modifications suite à des perturbations des sols (Constancias et al., 2014; Rousk et al., 2010; He et al., 2012). Il est possible de retrouver des indices renseignant sur la richesse des communautés comme le nombre d'OTUs (Unités Taxonomiques Opérationnelles ; Blaxter et al., 2005), le nombre de genres, le nombre d'espèces présents au sein des communautés (Roesch et al., 2007). La diversité d'une communauté peut aussi s'exprimer en terme d'équitabilité (ou evenness) ce qui renseigne sur l'égalité des populations au sein des communautés (Hill, 1973; Kennedy & Smith, 1995). Les communautés microbiennes peuvent enfin être mesurées par des indices de diversité se basant sur les résultats de richesse et

d'équitabilité, tels que le Shannon-Weaver (H') et l'indice de Simpson (Shannon et al., 1949; Hill, 1973; Kennedy & Smith, 1995).

- La composition taxonomique des communautés microbiennes

La composition des communautés microbiennes est le bioindicateur le plus précis actuellement disponible. Elle peut être obtenue par une approche de métagénomique avec le développement des techniques de séquençage « nouvelle génération » (séquençage à très haut-débit, Roche 454 Sequencing System, Illumina) (voir partie II.3). Cette approche de métagénomique a été utilisée pour caractériser les communautés microbiennes des sols au niveau du phylum, mais aussi des familles, des genres et des espèces (Nielsen et al., 2002) et mettre en évidence leur variation en fonction du mode d'occupation des sols (forêt, prairie, culture) (Nacke et al., 2011; Shange et al., 2012; Lienhard et al., 2013), ou encore par leurs propriétés physicochimiques (Lauber et al., 2009; Rousk et al., 2010; Zhelnina et al., 2015). La caractérisation de la composition microbienne permet de mettre en évidence certaines communautés spécifiques comme les champignons mycorhiziens et les bactéries nitrifiantes présentant un fort potentiel pour caractériser les retombées fonctionnelles des effets de la gestion des sols (Chang et al., 2001; Helgason et al., 1998).

De manière générale, l'utilisation d'un seul bioindicateur pour décrire la qualité des sols n'est pas suffisante, il est nécessaire d'en étudier une composante renseignant sur les aspects quantitatifs, qualitatifs et fonctionnels de différentes communautés (Shlote et al., 2003). Dans le cadre de cette thèse, deux bioindicateurs microbiens ont été étudiés et utilisés, ce sont la biomasse moléculaire microbienne et la diversité des communautés de bactéries et de champignons en termes d'indices et de composition taxonomique.

Chapitre II :
**Standardisation de deux bioindicateurs
microbiens**

Partie A :

La biomasse moléculaire microbienne : variabilité
méthodologique

La biomasse moléculaire microbienne rend compte de l'abondance des microorganismes telluriques et correspond au rendement d'extraction de l'ADN d'un sol (Dequiedt et al., 2011). C'est un indicateur quantitatif très global qui rend compte de la capacité d'un sol à héberger un plus ou moins grand nombre de microorganismes selon ses caractéristiques, son mode d'usage actuel et passé. Toutefois, de nombreuses méthodes ont été développées ces dernières années afin d'extraire l'ADN des sols et caractériser les communautés microbiennes (Leckie et al., 2004; Dequiedt et al., 2011). Et, force est de constater que les nombreuses procédures d'obtention de l'ADN de sol disponibles aujourd'hui ne sont pas équivalentes quant à leur efficacité d'extraction, avec des conséquences en termes de reproductibilité et de représentativité de la biomasse microbienne. Pour limiter la variabilité méthodologique des résultats obtenus et permettre des comparaisons robustes des résultats entre laboratoires, il est aujourd'hui nécessaire d'adopter une démarche de standardisation de cet outil. Dans cette optique, une procédure d'extraction de l'ADN a été standardisée et normalisée, il s'agit de la norme ISO 11063 (Petric et al., 2011). Cependant Plassart et al. (2012) ont démontré que cette procédure standardisée extrayait systématiquement moins d'ADN que deux autres procédures d'extraction, entraînant donc un biais dans les résultats. Une amélioration de cette méthode d'extraction a ainsi été proposée pour améliorer le rendement d'extraction et la représentativité des communautés microbiennes en termes d'abondance (http://www2.dijon.inra.fr/plateforme_genosol/plateforme-genosol; Terrat et al., 2012).

Dans un but de standardisation et d'une utilisation en routine de cette procédure, sa robustesse technique doit être éprouvée. C'est dans ce contexte que s'inscrit le premier travail expérimental de ma thèse, qui a eu pour objectif de mesurer la variabilité méthodologique et biologique de la biomasse moléculaire microbienne. Pour cela, deux études ont été menées parallèlement :

- 1) une analyse de la variabilité méthodologique du bioindicateur et la définition de sa réplicabilité et de sa répétabilité inter-jours et inter-manipulateurs
- 2) une analyse de la variabilité biologique du bioindicateur obtenue à partir de trois parcelles utilisées comme références et présentant des modes d'usage variés.

Les résultats obtenus pour ces deux études ont été présentés sous forme d'un article en français pour une publication dans une revue telle qu' *Etude et Gestion des Sols*.

Etude de la variabilité méthodologique d'un bioindicateur microbien : la biomasse moléculaire microbienne

E. Bourgeois¹, M. Lelièvre², S. Terrat¹, W. Horrigue¹, S. Dequiedt², P.-A. Maron¹, L. Ranjard¹

¹ INRA Dijon, UMR 1347 Agroécologie

² INRA Dijon, UMR 1347 Agroécologie, plateforme GenoSol

1. Introduction

Le sol est le principal réservoir de diversité microbienne de notre planète. En effet, plusieurs milliards de bactéries et de champignons très diversifiés peuvent être retrouvés dans un gramme de sol (Curtis & Sloan, 2005). Ces microorganismes participent au fonctionnement et à la qualité des écosystèmes terrestres car leur activité conditionne notamment la minéralisation de la matière organique indispensable au recyclage des nutriments nécessaires à la croissance végétale (azote, phosphore, potassium). Ils permettent également de diminuer les flux de polluants vers les nappes phréatiques et l'atmosphère, et contribue aussi à la structure du sol (Christensen, 1989; Gobat, 2010). Les communautés microbiennes sont sensibles aux variations environnementales, qu'elles soient d'origines anthropiques et/ou naturelles (Lejon et al., 2007; Nicolardot et al., 2007; Ranjard & Richaume, 2001). Ce sont donc potentiellement de bons indicateurs de l'état du milieu.

La biomasse microbienne est un indicateur global de la qualité microbiologique d'un sol, qui rend compte de l'abondance des microorganismes. Pendant longtemps, cet indicateur a été mesuré par la méthode de fumigation-extraction (Vance et al., 1987) mais, depuis le développement des outils moléculaires, la biomasse microbienne peut être estimée en mesurant le rendement d'extraction d'ADN du sol. Plusieurs travaux ont montré que les estimations de biomasse obtenues par fumigation-extraction sont corrélées avec la quantité d'ADN extraite du sol. En effet, Marstorp et al. (2000) et Widmer et al. (2006) démontrent une corrélation forte ($r = 0.96$ et 0.75 , respectivement) entre la quantité d'ADN contenu dans le sol et la biomasse microbienne mesurée par la méthode de fumigation-extraction. Ils en concluent que ces deux méthodes sont équivalentes pour estimer la biomasse microbienne du sol. Toutefois, si elles donnent une information équivalente, l'approche moléculaire de quantification de l'ADN est beaucoup plus facile et rapide à mettre en œuvre que la méthode plus historique de fumigation-extraction. Elle peut aussi être appliquée en moyen débit, ce qui

permet une acquisition massive de valeurs obtenues à partir d'échantillonnages comprenant un grand nombre d'échantillons. Des études récentes ont ainsi été réalisées à l'échelle nationale, avec l'analyse des 2200 échantillons du Réseau de Mesures de la Qualité du Sol (RMQS, Jolivet et al., 2008) qui a permis d'établir la première carte de la distribution de la biomasse microbienne sur le territoire français (Dequiedt et al., 2011). Ce travail a confirmé l'intérêt et la sensibilité de cette mesure de biomasse moléculaire microbienne pour mieux évaluer l'impact de certains modes d'usage sur le patrimoine biologique des sols (Dequiedt et al., 2011). Il a aussi permis la constitution d'un référentiel d'interprétation de cet indicateur à l'échelle nationale.

Au-delà de son intérêt pour l'estimation de la biomasse microbienne, l'extraction d'ADN représente la première étape fournissant l'ADN qui sert de matrice à l'ensemble des méthodes moléculaires de caractérisation des communautés par l'analyse du métagénome (PCR, hybridations, séquençage, etc.). La qualité de l'extraction va donc conditionner les résultats de ces analyses, et influencer sur les conclusions des travaux s'appuyant sur ces outils moléculaires (Terrat et al., 2012). De nombreuses procédures d'extraction existent à l'heure actuelle allant de kits d'extraction commercialisés aux « procédures maison » développées individuellement par les laboratoires de recherche. Pour standardiser cette étape clef, une procédure a récemment été développée et standardisée afin de pouvoir plus facilement comparer les résultats obtenus entre différents laboratoires, il s'agit de la norme ISO 11063 (Petric et al., 2011). Cette méthode d'extraction adaptée pour l'étude des communautés bactériennes l'est cependant moins pour l'étude des champignons (Plassart et al., 2012). Une amélioration de cette méthode d'extraction a donc été proposée afin d'augmenter le rendement d'extraction d'ADN et la représentativité des communautés microbiennes en termes d'abondance et de diversité (Terrat et al., 2012). Toutefois, pour une utilisation en routine de cette procédure pour mesurer l'indicateur « biomasse moléculaire », sa variabilité méthodologique doit être déterminée en termes de robustesse technique. La robustesse correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus en appliquant le procédé expérimental à plusieurs reprises dans des conditions déterminées. Selon les conditions d'exécution de l'essai, cette caractéristique s'exprime sous forme de réplicabilité, et de répétabilité de la méthode. La réplicabilité consiste en l'étroitesse de l'accord entre des résultats successifs obtenus pour le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dans les mêmes conditions (même manipulateur, même jour d'analyse). La répétabilité du bioindicateur correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus

pour le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire mais dans des conditions analytiques différentes (manipulateurs différents, jours d'analyse différents).

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail ont été (i) de tester la robustesse technique de la biomasse moléculaire microbienne au laboratoire en termes de réplicabilité, de répétabilité inter-jours et de répétabilité inter-manipulateurs; et (ii) de déterminer si cette variabilité technique de la biomasse obtenue pour un échantillon de sol est similaire ou supérieure à la variabilité biologique retrouvée sur le terrain, afin de mettre en évidence l'impact du travail du sol sur la variabilité de la biomasse au niveau de la parcelle agricole mais aussi le nombre d'échantillons de sol nécessaires pour obtenir une image représentative de la parcelle agricole.

2. Matériels et méthodes

2.1. Caractéristiques des sols et stratégies d'analyses

2.1.a. Variabilité méthodologique de la biomasse moléculaire microbienne

Les validations techniques de la mesure de la biomasse moléculaire ont été effectuées sur des sols présentant des caractéristiques pédo-climatiques et des modes d'usage différents. Ce choix a été motivé par le fait que les facteurs influençant le plus la biomasse microbienne sont le type de sol (les caractéristiques physico-chimiques) et le mode d'usage (forêt, culture, prairie...) (Dequiedt et al., 2011). Quatre sols ont été choisis comme références afin de vérifier que tous les tests effectués soient validés sur des types de sols représentatifs de ceux que l'on peut trouver en France. Ces sols proviennent d'Epoisses (département 21), de Lusignan (département 86), de Réthoville (département 50) et de Breuil (parc naturel du Morvan, département 58). Les échantillons ont été prélevés sur l'horizon 0-20cm du sol, lyophilisés à -80°C et stockés à -40°C au sein du conservatoire GenoSol (http://www2.dijon.inra.fr/plateforme_genosol/plateforme-genosol). Les propriétés physicochimiques de chaque sol, déterminées par le Laboratoire d'Analyse des Sols de l'INRA (Arras, France, <http://www5.lille.inra.fr/las>), sont présentées dans le Tableau II.1.

Sol	Argiles (<2 µm)	Limons (2/50 µm)	Sables (50/2000 µm)	pH	Carbone organique (C)	Azote total (N)	C/N
	g/kg				g/kg		
Epoisses	49,8	43,1	7,1	7,9	21,1	1,98	10,7
Lusignan	14	67,9	18,1	6,7	15,3	1,26	12,1
Réthoville	6,4	38,1	55,5	5,7	10,1	0,87	11,6
Breuil	20.1	20.4	59.5	4.1	76.1	4.16	18.3

Tableau II.1. Texture et caractéristiques physico-chimiques des quatre sols de référence

Epoisses est un sol de culture limono-calcaire, Lusignan un sol de prairie limoneux de pH neutre, Réthoville un sol sous monoculture de maïs sablo-limoneux acide, et Breuil un sol de forêt sablo-acide.

La détermination de la robustesse technique de la biomasse moléculaire microbienne a été définie en termes de réplicabilité et de répétabilité inter-jours et inter-manipulateurs. Afin d'étudier la réplicabilité du bioindicateur, la quantité d'ADN extrait a été comparée entre 12 extractions indépendantes réalisées à partir d'un même échantillon de sol, le même jour d'analyse par le même manipulateur, et ceci à partir des quatre sols de référence. Pour déterminer la répétabilité inter-jours, 12 extractions d'un même échantillon de sol ont été répétées sur trois jours différents pour les quatre sols de référence. La répétabilité inter-jours a été mesurée à partir du pool de des 36 valeurs de biomasse obtenues pour chaque sol de référence. Enfin la répétabilité entre différents manipulateurs a été étudiée en effectuant 12 extractions d'un même échantillon de sol par trois manipulateurs différents, un expérimenté (~ 2000 extractions), un intermédiaire (~ 500 extractions) et un novice (0 extraction) pour les quatre sols de référence. La répétabilité inter-jours a été mesurée à partir du pool des 36 valeurs de biomasse obtenues pour chaque sol de référence. Au total 144 extractions d'ADN microbien du sol ont été effectuées

2.1.b. Variabilité biologique vs variabilité technique de la biomasse moléculaire microbienne

Afin de comparer la variabilité méthodologique de la biomasse obtenue pour un échantillon de sol avec la variabilité biologique retrouvée sur le terrain, trois parcelles d'environ 1 ha et présentant des modes d'usage différents ont été échantillonnées en automne 2010 sur le paysage de Fénay (département 21) : une parcelle sous prairie temporaire semée avec un mélange contenant principalement du ray-grass, de la fétuque et du trèfle, non pâturée et régulièrement fauchée depuis 2002 ; une parcelle sous culture de blé sans labour, et une parcelle sous culture de blé avec labour. Comme précédemment, les sols ont été échantillonnés sur l'horizon 0-20cm, lyophilisés à -80°C et stockés au conservatoire GenoSol à -40°C. Pour chaque parcelle, les propriétés physicochimiques du sol ont été déterminées par le Laboratoire d'Analyse des Sols de l'INRA (Arras, France, <http://www5.lille.inra.fr/las>) et sont présentées dans le Tableau II.2.

Sol	Argiles (<2 µm)	Limons (2/50 µm)	Sables (50/2000 µm)	pH	Carbone organique (C)	Azote total (N)	C/N
	g/kg				g/kg		
Prairie	37 ± 5	55 ± 5	8 ± 1	8,2 ± 0,1	21,8 ± 2,8	1,83 ± 0,24	11,9 ± 0,7
Culture sans labour	44 ± 4	50 ± 4	5 ± 1	7,8 ± 0,3	18,9 ± 0,8	1,91 ± 0,19	9,9 ± 0,7
Culture avec labour	40 ± 4	54 ± 4	6 ± 1	8,0 ± 0,5	14,7 ± 1,0	1,31 ± 0,10	11,3 ± 0,5

Tableau II.2. Texture et caractéristiques physico-chimiques des trois parcelles de référence, (n = 60)

Sur chaque parcelle, 60 échantillons de sol ont été prélevés suivant une grille systématique carrée avec un pas de 12 m totalisant 50 points d'échantillonnage par parcelle auxquels ont été ajoutés 10 points distribués aléatoirement. A partir des 60 valeurs de biomasse moléculaire microbienne obtenues sur chaque parcelle, 6 échantillonnages aléatoires ont été effectués (3, 5, 10, 20, 30 et 60 valeurs). Ces échantillonnages ont été réalisés afin de déterminer le nombre minimal de répliques nécessaires pour obtenir une vision exhaustive de la biomasse de la parcelle et de définir si la variabilité spatiale est supérieure à la variabilité technique.

2.2. Extraction et quantification de l'ADN des sols

Le protocole d'extraction d'ADN utilisé a été décrit dans l'étude de Plassart et al. (2012). Il consiste à utiliser 1 g d'échantillon de sol (poids sec) broyé avec 5 mL d'un tampon contenant 100 mM de TRIS (pH 8), 100 mM d'EDTA (pH 8), 100 mM de NaCl et 2% (poids/volume) de SDS. 4 billes de verre de 4 mm, 2,5 g de billes de céramique de 1,4 mm et 2 g de billes de silice de 0,106 mm sont également ajoutés dans un tube Falcon de 15 mL et les échantillons sont homogénéisés 3 x 30 secondes à 4 m/sec dans l'agitateur FastPrep (MP Biomedicals, Illkirch, France). Les échantillons sont ensuite incubés au bain-marie pendant 30 minutes à 70°C puis centrifugés à 7000g pendant 5 minutes à 20°C. Les surnageants sont collectés et incubés 10 minutes dans la glace avec 1/10 du volume de 3 M d'acétate de potassium (pH 5,5) et centrifugés à 14000g pendant 5 minutes. Après précipitation avec un volume d'isopropanol glacial, les acides nucléiques sont nettoyés avec de l'éthanol à 70%, séchés à l'étuve à 60°C et resuspendus dans 200 µL d'eau ultra-pure stérile. Les échantillons d'ADN bruts sont révélés par électrophorèse sur un gel d'agarose calibré à 1% avec du bromure d'éthidium et photographiés par une caméra (Biocapt). Une gamme d'ADN de thymus de veau est incluse sur chaque gel et une courbe standard de concentration d'ADN est utilisée pour estimer la concentration finale d'ADN de l'échantillon brut. L'intensité de fluorescence du bromure d'éthidium est mesurée avec le logiciel ImageQuaNT®.

2.3. Analyses statistiques

Les valeurs de biomasse moléculaire microbienne obtenues ont été comparées entre elles avec le test de Kruskal-Wallis (utilisation du logiciel R). Pour chaque sol de référence, la variabilité méthodologique de l'indicateur a été exprimée en pourcentages de variation de l'écart-type par rapport à la valeur moyenne de biomasse microbienne.

3. Résultats et Discussion

3.1. Variabilité méthodologique du bioindicateur

3.1.a. Réplicabilité de la biomasse moléculaire microbienne

La réplicabilité de la biomasse microbienne a été déterminée en effectuant 12 extractions d'ADN à partir d'un même échantillon de sol, et ce pour les quatre sols choisis comme références de par leurs caractéristiques pédo-climatiques et leur mode d'usage différents. Les biomasses ont été quantifiées et les valeurs représentées dans la Figure II.1. En fonction du sol de référence, les valeurs moyennes de biomasse diffèrent. En effet le sol de Réthoville présente la valeur moyenne de biomasse la plus faible, (28 μg d'ADN/g sol) alors que le sol de Breuil, sous forêt et sans travail du sol, présente une biomasse très élevée (± 188 μg d'ADN/g sol). Les sols d'Epoisses et de Lusignan se positionnent quant à eux de façon intermédiaire entre ces deux extrêmes, avec des valeurs atteignant respectivement 70 et 42 μg d'ADN/g sol. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature qui montrent que la biomasse microbienne est généralement plus élevée dans les sols sous forêt que dans les sols sous culture (Constancias et al., 2015; Dequiedt et al., 2011). Ceci peut s'expliquer d'une part par la plus forte teneur en carbone généralement observée dans les sols sous forêt ainsi que par l'absence de travail du sol qui permet le maintien de l'intégrité de l'habitat microbien (Alvarez & Alvarez, 2000; Lienhard et al., 2013). A l'opposé, la faible valeur de biomasse observée dans le sol de Réthoville peut être attribuée d'une part à la faible teneur en carbone, à la texture sableuse de ce sol limitant la disponibilité en substrats pour la croissance microbienne, au pH acide de ce sol (Dequiedt et al., 2011; Garbeva et al., 2004; Rousk et al., 2010; Yao et al., 2000), mais aussi au mode d'usage représenté par une monoculture de maïs avec labour. Dans le cadre de notre étude, ces résultats confirment donc que la biomasse moléculaire microbienne est influencée par les propriétés physicochimiques et le mode d'usage (Dequiedt et al., 2011; Maron et al., 2011; Ranjard et al., 2009).

La réplicabilité de la biomasse moléculaire a été déterminée (Figure II.1). Les résultats montrent qu'elle varie en fonction des sols. Elle est élevée (environ 10% de variation) dans les deux sols d'Epoisses et de Breuil présentant des niveaux de biomasse élevés, et plus faible (environ 18% de variation) dans les deux autres sols qui présentaient des biomasses faibles. Ces résultats montrent donc que la réplicabilité de l'indicateur augmente avec la teneur en biomasse du sol.

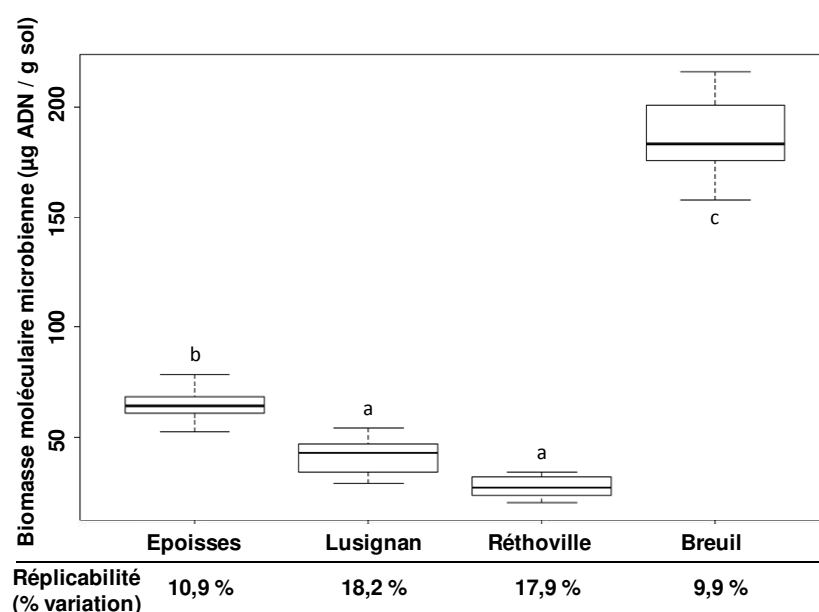


Figure II.1. Biomasses moléculaires microbiennes (µg ADN/g sol) obtenues pour les sols d'Epoisses, Lusignan, Réthoville et Breuil. La significativité des différences de biomasses a été mesurée avec le test de Kruskal-Wallis ($p < 0,0001$). La réplicabilité correspond aux pourcentages de variation de l'écart-type par rapport à la valeur moyenne de biomasse moléculaire microbienne.

L'étude de ces quatre sols permet d'obtenir une gamme de variation de la réplicabilité de la biomasse moléculaire microbienne entre 10 et 18 %. Cette variation, qui peut paraître importante, comprend une séquence technique complexe qui va de la pesée du sol jusqu'à la quantification de l'ADN microbien sur gel d'agarose. Elle est en conséquence plutôt faible lorsque l'on intègre toutes les étapes techniques qui pourraient l'expliquer.

3.1.b. Répétabilité inter-jours de la biomasse moléculaire microbienne

Afin de déterminer la répétabilité inter-jours du bioindicateur, les extractions d'ADN et les quantifications de biomasses moléculaires microbiennes ont été répétées sur trois jours différents pour les quatre sols de références (Jour 1, Jour 2, Jour 3) par le même manipulateur et toutes les valeurs de biomasse moléculaire ont été poolées pour obtenir un échantillon « Inter-jours » permettant d'évaluer la répétabilité de la mesure de biomasse moléculaire. Pour trois des quatre sols étudiés (Lusignan, Réthoville et Breuil), les résultats montrent que les biomasses microbiennes varient significativement en fonction du jour d'analyse (Figure II.2). Il est toutefois important de noter que ces variations ne modifient pas la hiérarchie entre les 4 sols.

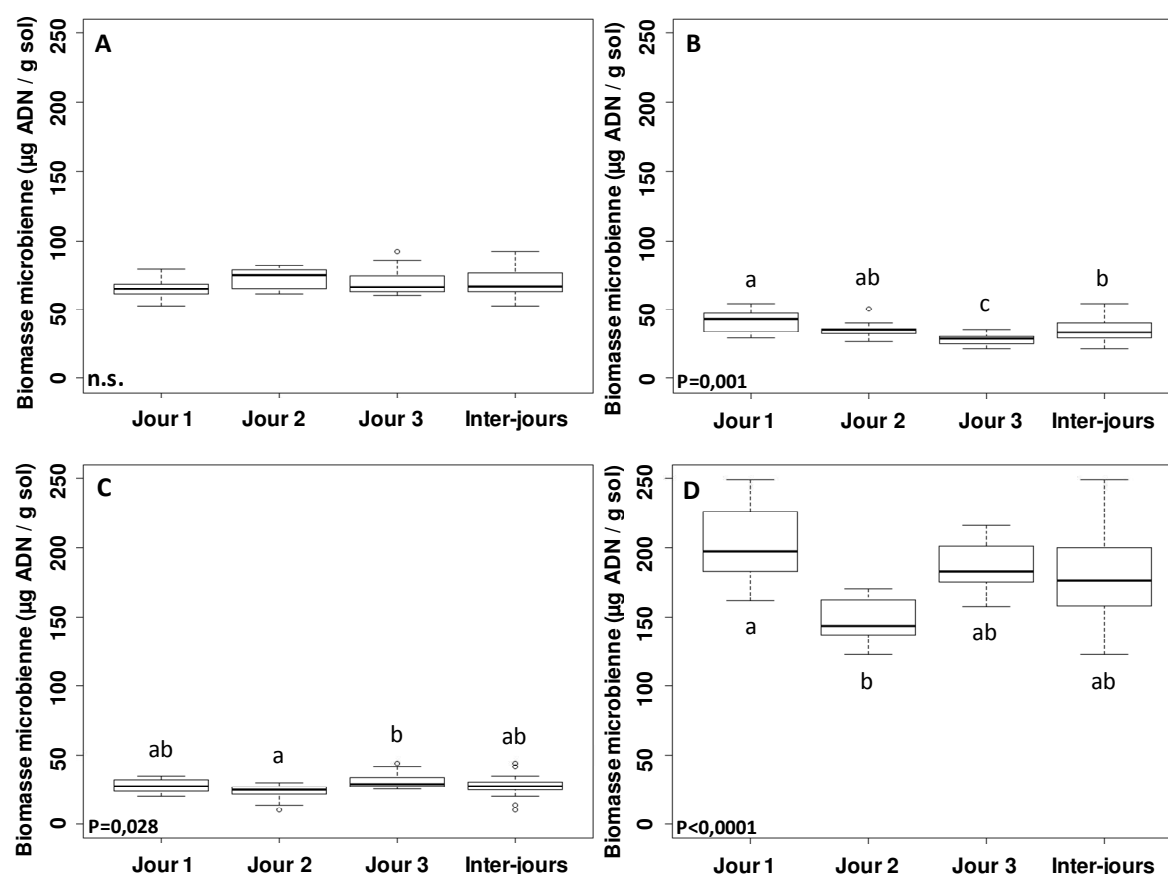


Figure II.2. Biomasses moléculaires microbiennes (µg ADN/g sol) obtenues les trois jours d'analyse (Jour 1, Jour 2, Jour 3) ainsi que les valeurs des trois jours poolées (Inter-jours) pour les quatre sols de références (A) Epoisses, (B) Lusignan, (C) Réthoville, (D) Breuil. Les significativités des différences de biomasses ont été mesurées avec le test de Kruskal-Wallis.

Pour chaque sol, la réplicabilité ne change pas en fonction du jour d'extraction (Tableau II.3). Cependant les différences de biomasse observées entre les différents jours d'analyse entraînent une diminution de la répétabilité de l'indicateur (Tableau II.3), avec des variations de quantification de biomasse s'élevant à 17,4 % pour Breuil, de 22,6 % pour Lusignan, de 23,6 % pour Réthoville. Pour le sol d'Epoisses dont les valeurs de biomasse entre les différents jours d'analyse étaient les plus stables la répétabilité est supérieure avec seulement 12,7 % de variation (Figure II.2). Cette meilleure répétabilité de la biomasse moléculaire pourrait être expliquée par la texture de ce sol. En effet ce sol est composé principalement d'argiles (50%) et de limons (43%), et possède donc une structure fine qui entraîne une meilleure homogénéisation des communautés microbiennes dans ces environnements protégés. Pour ces quatre sols de référence, la répétabilité de la biomasse est inférieure à sa réplicabilité.

Sol	Répliquabilité Jour 1 (% variation)	Répliquabilité Jour 2 (% variation)	Répliquabilité Jour 3 (% variation)	Répétabilité inter-jours (% variation)
Epoisses	10,9	10,3	14,8	12,7
Lusignan	18,2	16,6	13,1	22,6
Réthoville	17,9	26,7	18,7	23,6
Breuil	13,5	10,6	9,9	17,4

Tableau II.3. Etude des répliquabilités intra-jour et de la répétabilité inter-jours de la biomasse moléculaire microbienne mesurées en termes de pourcentages de variation de l'écart-type par rapport à la valeur moyenne de biomasse moléculaire microbienne.

L'ensemble de ces résultats montre que la variabilité de la biomasse est augmentée lorsque l'extraction d'ADN est effectuée sur plusieurs jours. Il est donc important de travailler au maximum le même jour pour extraire l'ADN des sols et le quantifier. Si cela n'est pas possible techniquement, il devient nécessaire de gérer les échantillons de sol de façon aléatoire, sans les trier en fonction du mode d'usage et des caractéristiques physico-chimiques des sols afin de limiter le biais inhérent à la répétabilité de la méthode.

3.1.c. Répétabilité inter-manipulateurs de la biomasse moléculaire microbienne

La répétabilité inter-manipulateurs de la biomasse moléculaire microbienne a été déterminée en effectuant 12 extractions d'ADN à partir d'un même échantillon de sol par un manipulateur expérimenté, un manipulateur moins expérimenté et un manipulateur novice. Cette expérimentation a été menée pour les quatre sols de référence. Les valeurs de biomasse moléculaire ont été poolées pour obtenir un échantillon « Inter-manipulateurs ». Pour chaque sol, il a été constaté que le manipulateur novice biaise les valeurs moyennes de biomasse moléculaire en obtenant des valeurs toujours inférieures à celles obtenues par les expérimentateurs expert et intermédiaire. Les valeurs obtenues par ces deux derniers sont en revanche similaires (Figure II.3).

Pour un même sol, la répliquabilité ne varie pas en fonction de l'expérimentateur (Figure II.3). En revanche, le biais dû au manipulateur novice lors de la quantification de la biomasse diminue la répétabilité de l'indicateur. En effet, la variabilité de la répétabilité inter-manipulateurs varie de 16,7 % pour Breuil (variation de la répliquabilité de 9,9 %) à 31,8 % pour Lusignan (au lieu de 18,2 %, Tableau II.4).

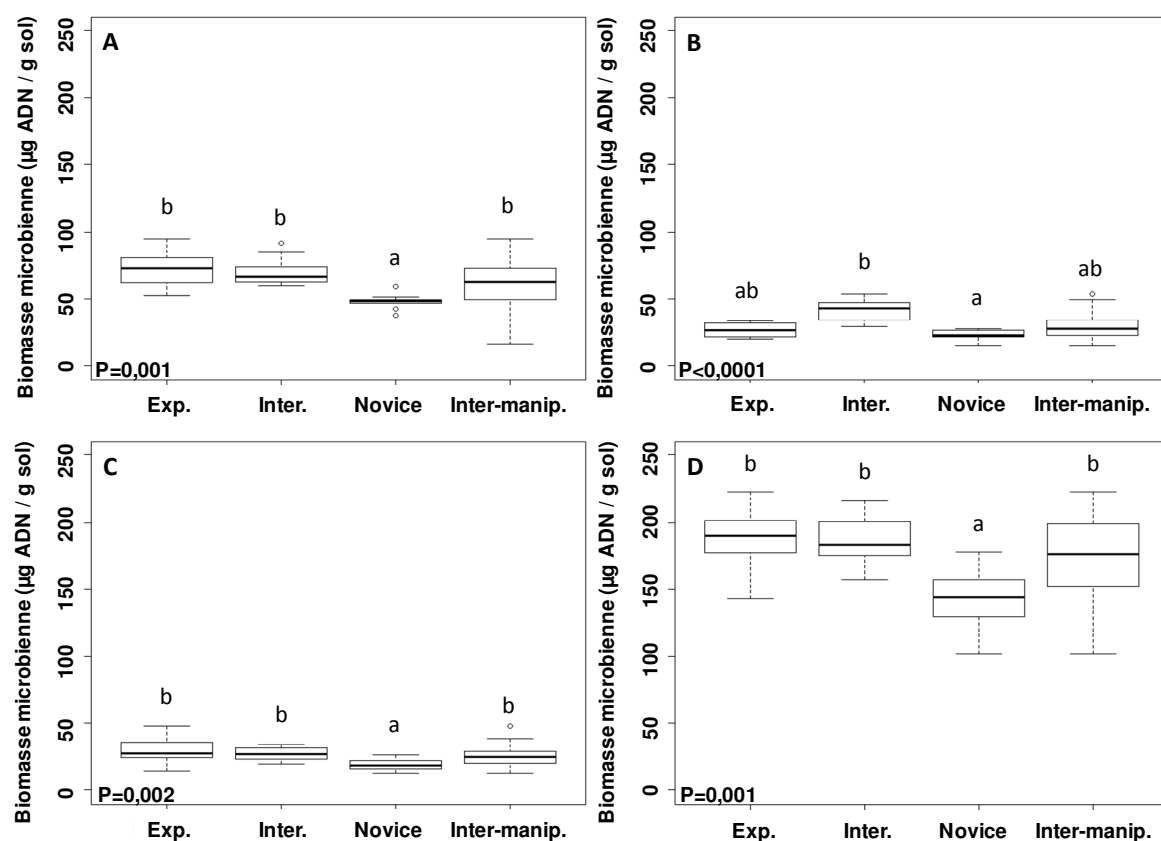


Figure II.3. Biomasses moléculaires microbiennes (µg ADN/g sol) obtenues par les manipulateurs expérimenté (Exp.), intermédiaire (Inter.) et novice pour les quatre sols de références (A) Epoisses, (B) Lusignan, (C) Réthoville, (D) Breuil. Les significativités des différences de biomasses ont été mesurées avec le test de Kruskal-Wallis.

Sol	Réplabilité Expérimenté (% variation)	Réplabilité Intermédiaire (% variation)	Réplabilité Novice (% variation)	Réplabilité inter-manipulateurs (% variation)
Epoisses	17,5	14,8	10,9	26,1
Lusignan	18,7	18,2	16,5	31,8
Réthoville	28,8	17,9	22,7	29,8
Breuil	11,3	9,9	14,5	16,7

Tableau II.4. Etude des réplicabilités intra-manipulateur et de la répétabilité inter-manipulateurs de la biomasse moléculaire microbienne mesurées en termes de pourcentages de variation de l'écart-type par rapport à la valeur moyenne de biomasse moléculaire microbienne.

Cette étude a montré une augmentation de la variabilité du bioindicateur et donc une baisse de sa répétabilité due à une diminution de l'efficacité d'extraction de l'ADN des différents sols par le manipulateur novice, probablement en raison d'une moins bonne maîtrise du protocole d'extraction et de ses « astuces » techniques.

3.1.d. Conclusion sur la robustesse technique la biomasse moléculaire microbienne

Toutes les analyses effectuées dans ce travail montrent que la fidélité technique du bioindicateur peut varier en fonction du sol mais que les variabilités techniques ne masquent pas les différences entre les sols. Pour illustration, les différentes valeurs de réplicabilité, de répétabilité inter-jours et de répétabilité inter-manipulateurs obtenues pour chacun des 4 sols sont représentées sur la Figure II.4. Comme le montre cette figure, la réplicabilité est toujours meilleure que la répétabilité inter-jours ou inter-manipulateurs. Ces analyses nous permettent d'évaluer une variabilité générale d'environ 20% de la biomasse moléculaire microbienne obtenue avec cette méthode d'extraction. La connaissance de cette valeur est importante, car la biomasse moléculaire microbienne étant utilisée en routine comme bioindicateur microbien de la qualité d'un sol, elle va permettre de faire des diagnostics robustes, en intégrant cette variabilité dans le diagnostic.

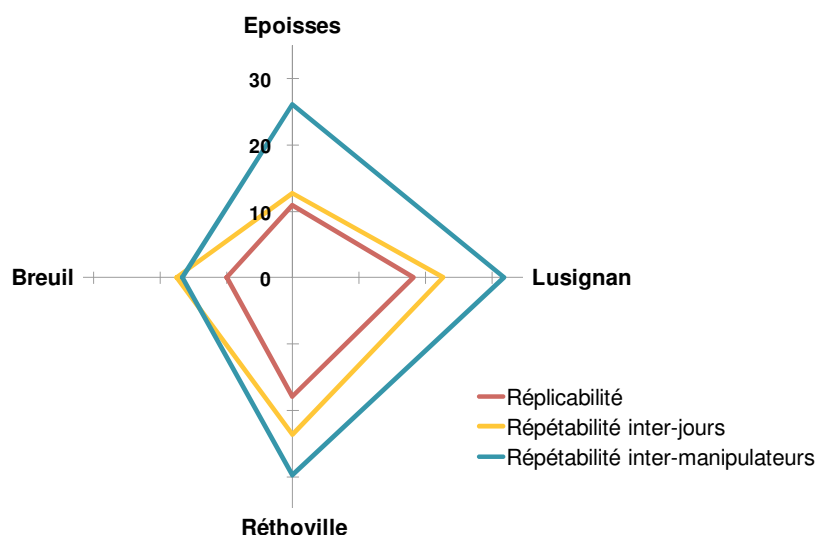


Figure II.4. Schéma récapitulatif de la variabilité technique du bioindicateur (pourcentages de variation de l'écart-type).

Ces travaux permettent aussi de proposer des préconisations pour minimiser les biais inhérents aux différentes étapes techniques de la mesure de l'indicateur et garantir la qualité des résultats générés dans le cadre d'une utilisation en routine avec le moins de variabilité possible :

- pour chaque échantillonnage, un seul manipulateur expérimenté doit effectuer les analyses, ce qui permettra de supprimer la variabilité inter-manipulateurs et ainsi de diminuer la gamme de variation du bioindicateur.
- les analyses seront effectuées au maximum le même jour pour limiter la variabilité entre différents jours d'analyse. Il est donc nécessaire de garder le même expérimentateur pour un

même projet et de travailler sur plusieurs jours, plutôt que de faire appel à plusieurs techniciens différents pour effectuer une analyse le même jour.

- seule la variation de la réplicabilité du bioindicateur ne pourra pas être éliminée mais améliorée par une formation accrue du technicien et une standardisation encore plus importante des étapes techniques.

3.2. Variabilité biologique du bioindicateur

Afin de déterminer la variabilité biologique de la biomasse microbienne moléculaire mesurée au terrain, les biomasses moléculaires microbiennes de trois parcelles d'environ 1 ha et représentatives d'un gradient d'intensité d'usage du sol (une prairie, une culture sans labour et une culture avec labour) échantillonnées en automne 2010 sur le paysage de Fénay (département 21) ont été analysées. Pour chaque parcelle, 6 échantillonnages aléatoires ont été effectués (3, 5, 10, 20, 30 et 60 valeurs de biomasse microbienne) afin de déterminer le nombre minimal de répliques nécessaires pour obtenir une vision représentative de la parcelle. Les biomasses obtenues pour les six échantillonnages ont été représentées dans la Figure II.5.

Les résultats montrent que les valeurs moyennes de biomasse diffèrent entre les trois parcelles, avec Prairie ($\pm 70 \mu\text{g d'ADN/g sol}$) > Culture sans labour ($\pm 50 \mu\text{g d'ADN/g sol}$) > Culture avec labour ($\pm 37 \mu\text{g d'ADN/g sol}$). Ces résultats montrent que la biomasse moléculaire diminue avec l'augmentation de l'intensité d'usage agricole du sol. Dans notre étude, cette décroissance peut être attribuée (i) au travail du sol dont l'effet négatif sur la biomasse *via* la destruction de l'habitat microbiens et la rupture des hyphes mycéliens est bien décrit dans la littérature (Aslam et al., 1999; Helgason et al., 2010; Jacinthe & Lal, 2009; Lienhard et al., 2013), (ii) à la teneur du sol en carbone qui décroît avec l'intensité d'usage du sol (Tableau 2) et qui détermine la disponibilité en substrats pour supporter le développement microbien (Banerjee et al., 2006; Wright et al., 2005). Dans le cas de la prairie, la présence de plantes pérennes peut aussi expliquer l'augmentation de biomasse observée car elle est associée à la libération d'exsudats racinaires reconnus pour stimuler la biomasse microbienne (Kanová et al., 2010; Purakayastha et al., 2009). Contrairement aux 4 sols de la partie précédente, la texture du sol ne peut en revanche pas expliquer les différences observées car elle est similaire entre les trois parcelles.

L'analyse de la valeur moyenne de biomasse moléculaire mesurée à partir d'échantillonnages comprenant un nombre croissant d'échantillons (3/5/10/20/30/60) montre que pour chaque sol, une valeur de biomasse représentative de la parcelle est obtenue à partir

de 3 échantillons choisis aléatoirement (Figure II.5). En effet, les valeurs moyennes de biomasse retrouvées dès trois échantillons sont similaires à celles retrouvées pour soixante échantillons de sol.

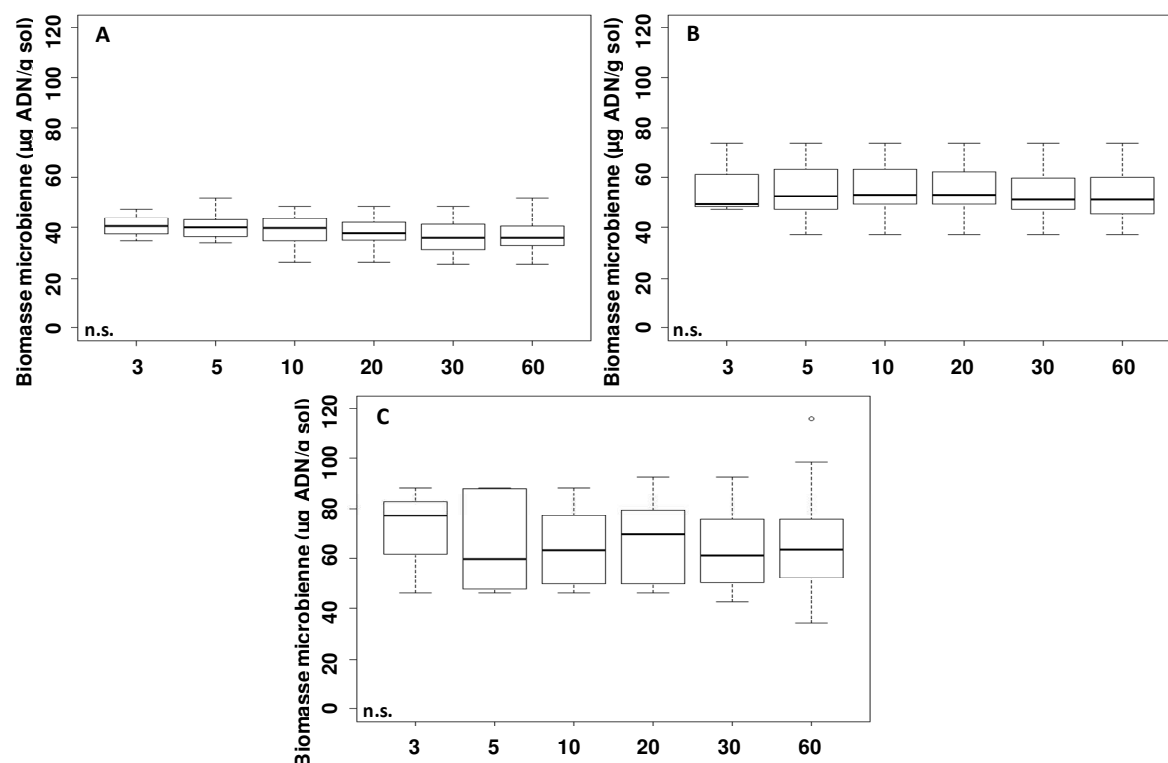


Figure II.5. Biomasses moléculaires microbiennes obtenues par six échantillonnages aléatoires (3, 5, 10, 20, 30, 60 valeurs) pour les sols de (A) Culture avec labour, (B) Culture sans labour, (C) Prairie. Les significativités des différences de biomasses ont été mesurées avec le test de Kruskal-Wallis.

Bien que les valeurs moyennes de biomasse soient représentatives de la parcelle dès trois échantillons, la gamme de variation entre les différentes mesures augmente lorsque peu d'échantillons sont prélevés. Plus précisément, les résultats montrent que pour les parcelles « Culture sans labour » et « Prairie », les échantillonnages aléatoires de trois et cinq valeurs de biomasse présentent des variabilités supérieures aux échantillonnages comprenant plus de valeurs.

La gamme de variation des valeurs mesurées varie entre les trois parcelles, et ce quel que soit le nombre d'échantillons pris en compte. Plus précisément, nos résultats montrent que la variabilité au terrain diminue avec l'intensité d'usage du sol selon le gradient Culture avec labour (16% de variation) < Culture sans labour (20% de variation) < Prairie (25% de variation) (Figure II.6). Dans notre étude, le travail du sol peut contribuer à expliquer ces résultats car le labour est connu pour homogénéiser le sol et donc réduire l'hétérogénéité à

l'échelle de la parcelle. Dans la prairie au contraire, l'absence de labour ainsi que la présence d'un couvert végétal plurispécifique et spatialement hétérogène (ray-grass, de la fétuque et du trèfle) peuvent expliquer l'augmentation de la variabilité de l'indicateur à l'échelle de la parcelle.

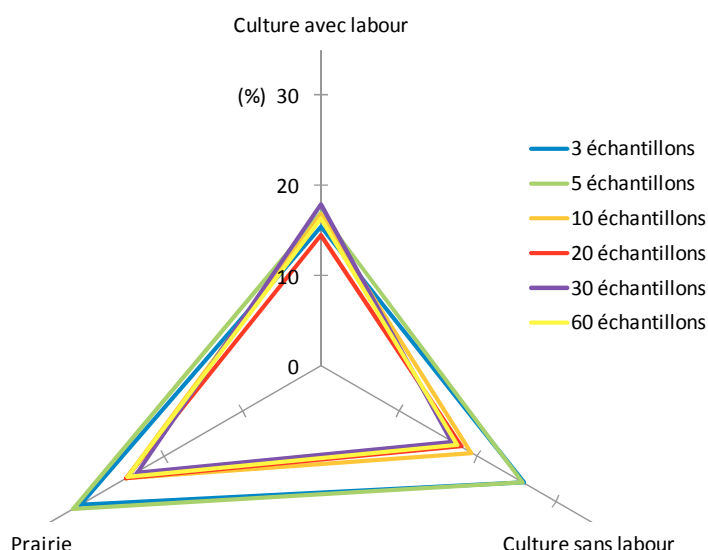


Figure II.6. Schéma récapitulatif de la variabilité au terrain de la biomasse moléculaire microbienne (pourcentages de variation de l'écart-type).

Cette étude a permis de mettre en évidence le nombre d'échantillons de sol nécessaires pour obtenir une image représentative de la parcelle agricole. En effet, 3 à 10 échantillons de sol suffisent pour obtenir une vision exhaustive d'une parcelle d'environ un hectare quel que soit le mode d'usage et les caractéristiques physico-chimiques des sols. Ces résultats peuvent donc aider à mettre au point des stratégies d'échantillonnages en optimisant le nombre de répliques de sol à prélever pour avoir une bonne représentativité.

4. Conclusion

Cette étude a permis d'évaluer la fidélité technique de l'indicateur « biomasse moléculaire » et ainsi d'identifier les étapes clés du mode opératoire permettant de minimiser sa variabilité méthodologique. Elle a également démontré qu'un manipulateur novice biaise les résultats de biomasse retrouvés. Il est donc nécessaire d'avoir des techniciens formés aux techniques d'extraction d'ADN du sol pour améliorer la robustesse des analyses. Il est plus judicieux de faire travailler un seul expérimentateur sur plusieurs jours pour un même

échantillonnage plutôt que plusieurs expérimentateurs le même jour. L'ensemble de ces résultats montre aussi que l'hétérogénéité spatiale à l'échelle de la parcelle induit une variabilité de l'indicateur, dont l'importance dépend du mode d'usage. Cette variabilité ne remet toutefois pas en cause la capacité de l'indicateur à discriminer les différents modes d'usage. Dans une optique de diagnostique, nos résultats montrent qu'un nombre de trois répétitions peut être suffisant pour obtenir des valeurs moyennes représentatives de la parcelle. En revanche, le nombre d'échantillons doit être supérieur si l'objectif est de capter l'hétérogénéité spatiale de la parcelle.

5. Références bibliographiques

- Alvarez, C. R., & Alvarez, R. (2000). Short-term effects of tillage systems on active soil microbial biomass. *Biology and Fertility of Soils*, 31(2), 157–161. <http://doi.org/10.1007/s003740050639>
- Aslam, T., Choudhary, M. A., & Saggar, S. (1999). Tillage impacts on soil microbial biomass C, N and P, earthworms and agronomy after two years of cropping following permanent pasture in New Zealand. *Soil and Tillage Research*, 51(1–2), 103–111. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0167-1987\(99\)00032-X](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0167-1987(99)00032-X)
- Banerjee, B., Aggarwal, P. K., Pathak, H., Singh, A. K., & Chaudhary, A. (2006). Dynamics of Organic Carbon and Microbial Biomass in Alluvial Soil With Tillage and Amendments in Rice-wheat Systems. *Environmental Monitoring and Assessment*, 119(1-3), 173–189. <http://doi.org/10.1007/s10661-005-9021-8>
- Christensen, M. (1989). A view of fungal ecology. *Mycologia*, 1–19.
- Constancias, F., Terrat, S., Saby, N. P. A., Horrigue, W., Villerd, J., Guillemin, J.-P., ... Chemidlin Prévost-Bouré, N. (2015). Mapping and determinism of soil microbial community distribution across an agricultural landscape. *MicrobiologyOpen*, 4(3), 505–517. <http://doi.org/10.1002/mbo3.255>
- Curtis, T. P., & Sloan, W. T. (2005). Exploring Microbial Diversity— A Vast Below. *Science*, 39(1998), 2004–2006. <http://doi.org/10.1126/science.1118176>
- Dequiedt, S., Saby, N. P. A., Lelievre, M., Jolivet, C., Thioulouse, J., Toutain, B., ... Ranjard, L. (2011). Biogeographical patterns of soil molecular microbial biomass as influenced by soil characteristics and management. *Global Ecology and Biogeography*, 20(4), 641–652. <http://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2010.00628.x>
- Garbeva, P., van Veen, J. A., & van Elsas, J. D. (2004). MICROBIAL DIVERSITY IN SOIL: Selection of Microbial Populations by Plant and Soil Type and Implications for Disease Suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, 42(1), 243–270. <http://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.012604.135455>
- Gobat, J. M., Aragno, M., & Matthey, W. (2010). *Le sol vivant: bases de pédologie, biologie des sols*.
- Helgason, B. L., Walley, F. L., & Germida, J. J. (2010). No-till soil management increases microbial biomass and alters community profiles in soil aggregates. *Applied Soil Ecology*, 46(3), 390–397. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.10.002>
- Jacinthe, P.-A., & Lal, R. (2009). Tillage Effects on Carbon Sequestration and Microbial Biomass in Reclaimed Farmland Soils of Southwestern Indiana. *Soil Science Society of America Journal*, 73(2), 605. <http://doi.org/10.2136/sssaj2008.0156>
- Jolivet, C., Arrouays, D., & Boulonne, L. (2008). Le Réseau de mesures de la Qualité des sols de France (RmQs) Etat d ' avancement et premiers résultats. *Etude et Gestion Des Sols*, 13, 149–164.

- Kanová, H., Carre, J., Vránová, V., Rejsek, K., & Formánek, P. (2010). Organic compounds in root exudates of *Miscanthus x Giganteus* Greef et Deu and limitation of microorganisms in its rhizosphere by nutrients. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*.
- Lejon, D. P. H., Nowak, V., Bouko, S., Pascault, N., Mougél, C., Martins, J. M. F., & Ranjard, L. (2007). Fingerprinting and diversity of bacterial copA genes in response to soil types, soil organic status and copper contamination. *FEMS Microbiology Ecology*, 61(3), 424–437. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00365.x>
- Lienhard, P., Tivet, F., Chabanne, A., Dequiedt, S., Lelièvre, M., Sayphoummie, S., ... Ranjard, L. (2013). No-till and cover crops shift soil microbial abundance and diversity in Laos tropical grasslands. *Agronomy for Sustainable Development*, 33(2), 375–384. <http://doi.org/10.1007/s13593-012-0099-4>
- Maron, P.-A., Mougél, C., & Ranjard, L. (2011). Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. *Comptes Rendus Biologies*, 334(5-6), 403–411. <http://doi.org/10.1016/j.crvi.2010.12.003>
- Marstorp, H., Guan, X., & Gong, P. (2000). Relationship between dsDNA, chloroform labile C and ergosterol in soils of different organic matter contents and pH. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(6), 879–882. [http://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00210-2](http://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00210-2)
- Nicolardot, B., Bouziri, L., Bastian, F., & Ranjard, L. (2007). A microcosm experiment to evaluate the influence of location and quality of plant residues on residue decomposition and genetic structure of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(7), 1631–1644. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.01.012>
- Petric, I., Philippot, L., Abbate, C., Bispo, A., Chesnot, T., Hallin, S., ... Martin-Laurent, F. (2011). Inter-laboratory evaluation of the ISO standard 11063 “Soil quality — Method to directly extract DNA from soil samples.” *Journal of Microbiological Methods*, 84(3), 454–460. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.01.016>
- Plassart, P., Terrat, S., Thomson, B., Griffiths, R., Dequiedt, S., Lelièvre, M., ... Ranjard, L. (2012). Evaluation of the ISO Standard 11063 DNA Extraction Procedure for Assessing Soil Microbial Abundance and Community Structure. *PLoS ONE*, 7(9), e44279. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0044279>
- Purakayastha, T. J., Smith, J. L., & Huggins, D. R. (2009). Microbial biomass and N cycling under native prairie, conservation reserve and no-tillage in Palouse soils. *Geoderma*, 152(3–4), 283–289. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2009.06.013>
- Ranjard, L., Dequiedt, S., Jolivet, C., Saby, N. P. a, Thioulouse, J., Harmand, J., ... Lemanceau, P. (2009). Biogeography of soil microbial communities: A review and a description of the ongoing French national initiative. *Sustainable Agriculture*, 2, 857–865. http://doi.org/10.1007/978-94-007-0394-0_37
- Ranjard, L., & Richaume, A. (2001). Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Research in Microbiology*, 152(8), 707–716. [http://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01251-7](http://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01251-7)
- Rousk, J., Baath, E., Brookes, P. C., Lauber, C. L., Lozupone, C., Caporaso, J. G., ... Fierer, N. (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *Isme Journal*, 4, 1340–1351. <http://doi.org/10.1038/ismej.2010.58>
- Terrat, S., Christen, R., Dequiedt, S., Lelièvre, M., Nowak, V., Regnier, T., ... Ranjard, L. (2012). Molecular biomass and MetaTaxogenomic assessment of soil microbial communities as influenced by soil DNA extraction procedure. *Microbial Biotechnology*, 5(1), 135–141. <http://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00307.x>
- Vance, E. D., Brookes, P. C., & Jenkinson, D. S. (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, 19(6), 703–707. [http://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](http://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6)

- Widmer, F., Rasche, F., Hartmann, M., & Fliessbach, A. (2006). Community structures and substrate utilization of bacteria in soils from organic and conventional farming systems of the DOK long-term field experiment. *Applied Soil Ecology*, 33(3), 294–307. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.09.007>
- Wright, A. L., Hons, F. M., & Matocha Jr., J. E. (2005). Tillage impacts on microbial biomass and soil carbon and nitrogen dynamics of corn and cotton rotations. *Applied Soil Ecology*, 29(1), 85–92. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2004.09.006>
- Yao, H., He, Z., Wilson, M., & Campbell, C. (2000). Microbial Biomass and Community Structure in a Sequence of Soils with Increasing Fertility and Changing Land Use. *Microbial Ecology*, 40(3), 223–237. <http://doi.org/10.1007/s002480000053>
- <http://www5.lille.inra.fr/las>
- http://www2.dijon.inra.fr/plateforme_genosol/plateforme-genosol

Partie B :

La diversité taxonomique des bactéries et des
champignons : robustesse technique

Ces dernières années, de nombreux efforts ont été consacrés à l'optimisation des procédures d'extraction d'ADN des sols dans le but d'obtenir des échantillons adaptés et représentatifs permettant une bonne caractérisation aussi bien quantitative que qualitative des communautés microbiennes (Petric et al., 2011; Terrat et al., 2012). Des outils d'empreinte moléculaire tels que la RISA (rRNA Intergenic Spacer Analysis, Ranjard et al., 2000), la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) ou encore la TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis, Muyzer & Smalla, 1998) permettaient d'obtenir la structure génétique des communautés par génotypage à partir de l'ADN du sol obtenu avec ces procédures d'extraction adaptées. De nos jours des outils de pointe tel que le séquençage massif permettent d'avoir accès à la diversité microbienne, un second bioindicateur microbien, et d'effectuer des inventaires taxonomiques avec une relativement bonne exhaustivité. La diversité des communautés bactériennes et de champignons est un bioindicateur qualitatif très précis rendant compte aussi bien de la diversité par la mesure d'indices (*i.e.* richesse, evenness, Shannon), que de la structure et de la composition taxonomique des communautés. Les outils permettant sa détermination sont toutefois très sensibles et il paraît donc important de réévaluer si les procédures d'extraction d'ADN des sols sont toujours adaptées pour ces nouvelles technologies, afin de confirmer ou non leur capacité à estimer la diversité taxonomique bactérienne et de champignons et de déterminer le protocole le plus efficace pour des études de métagénomique.

Une étude menée par Plassart et al. en 2012 a permis de déterminer l'influence de trois procédures d'extraction d'ADN du sol sur la biomasse microbienne, les densités bactériennes et de champignons et les communautés (t-RFLP). Les trois procédures testées étaient la norme ISO 11063, un « protocole maison » (GnS-GII), et une norme ISO modifiée avec une lyse mécanique comme celle du « protocole maison » (ISOm). La biomasse moléculaire microbienne et les densités de bactéries et de champignons sont apparues supérieures lorsque que les extractions étaient effectuées avec les deux procédures non ISO 11063. Ils ont aussi montré que la structure des communautés de champignons étaient très dépendantes de la méthode d'extraction.

Dans ce contexte, le deuxième travail expérimental de ma thèse a été d'évaluer l'influence de ces trois mêmes procédures d'extraction d'ADN sur la diversité taxonomique des communautés de bactéries et de champignons à partir des mêmes sols de référence, et ainsi de déterminer la robustesse technique de l'analyse de la diversité microbienne allant de

l'étape d'extraction d'ADN du sol à l'analyse bioinformatique et de déterminer la procédure d'extraction la plus efficace pour des études intégratives de métagénomique microbienne du sol.

Cette étude est présentée sous la forme d'un article scientifique publié en 2015 dans *Microbial biotechnology*.

microbial biotechnology

Open Access

Meta-barcoded evaluation of the ISO standard 11063 DNA extraction procedure to characterize soil bacterial and fungal community diversity and composition

Sebastien Terrat,^{1†} Pierre Plassart,^{1†} Emilie Bourgeois,^{2†} Stéphanie Ferreira,³ Samuel Dequiedt,¹ Nathalie Adele-Dit-De-Renseville,³ Philippe Lemanceau,² Antonio Bispo,⁴ Abad Chabbi,⁵ Pierre-Alain Maron^{1,2} and Lionel Ranjard^{1,2*}

¹INRA, UMR1347 Agroécologie, Plateforme GenoSol, Dijon, France.

²INRA, UMR1347 Agroécologie, Dijon, France.

³Equipe R&D Santé-Environnement, Campus Pasteur, Genoscreen, Lille, France.

⁴Service Agriculture et Forêt, ADEME, Angers Cedex 01, France.

⁵INRA-URP3F, Lusignan, France.

Summary

This study was designed to assess the influence of three soil DNA extraction procedures, namely the International Organization for Standardization (ISO-11063, GnS-GII and modified ISO procedure (ISOm), on the taxonomic diversity and composition of soil bacterial and fungal communities. The efficacy of each soil DNA extraction method was assessed on five soils, differing in their physico-chemical characteristics and land use. A meta-barcoded pyrosequencing approach targeting 16S and 18S rRNA genes was applied to characterize soil microbial communities. We first observed that the GnS-GII introduced some heterogeneity in bacterial composition between replicates. Then, although no major difference was observed between extraction procedures for soil bacterial diversity, we saw that the number of fungal genera could be underestimated by the ISO-11063. In particular, this procedure underestimated

the detection in several soils of the genera *Cryptococcus*, *Pseudallescheria*, *Hypocrea* and *Plectosphaerella*, which are of ecological interest. Based on these results, we recommend using the ISOm method for studies focusing on both the bacterial and fungal communities. Indeed, the ISOm procedure provides a better evaluation of bacterial and fungal communities and is limited to the modification of the mechanical lysis step of the existing ISO-11063 standard.

Introduction

During the last three decades, the challenge to better characterize soil microbial communities has led to the development of culture-independent techniques that are well suited to deciphering the huge diversity of soil microbes as they provide access to previously hidden genetic resources (Martin-Laurent *et al.*, 2001). These methods are based essentially on the direct extraction and characterization of soil DNA. In this context, most efforts have been devoted to optimizing the soil DNA extraction procedure in order to obtain suitable representative extracts for quantitative and qualitative characterization of the microbial communities (Roesch *et al.*, 2007; Rajendhran and Gunasekaran, 2008; Terrat *et al.*, 2012). These efforts led to the development of various homemade DNA extraction protocols and even commercial kits (Zhou *et al.*, 1996; Martin-Laurent *et al.*, 2001; Delmont *et al.*, 2011a; Terrat *et al.*, 2012). However, each method had its own advantages and potential biases, leading to variations in DNA representativeness and consequently to effects on soil microbial assessments, making comparisons between studies impossible (Zhou *et al.*, 1996; Martin-Laurent *et al.*, 2001; Terrat *et al.*, 2012). To deal with this issue, Delmont and colleagues (2011b) suggested that several soil sampling and DNA extraction strategies should be combined to access the whole soil microbial metagenome in terms of species richness. However, this approach is clearly not applicable or relevant to wide-scale studies, where time and cost constraints make the need to use a standardized single DNA extraction procedure obvious (Dequiedt *et al.*, 2011).

Received 25 April, 2014; revised 31 July, 2014; accepted 31 July, 2014. *For correspondence. E-mail: ranjard@dijon.inra.fr; Tel. 33(0)380693088; Fax 33(0)380693224. †These authors contributed equally to the work.

doi:10.1111/1751-7915.12162

Funding Information This work involving technical facilities at the GenoSol platform of the infrastructure ANAEE-France received a grant from the French state through the National Agency for Research under the program 'Investments for the Future' (reference ANR-11-INBS-0001), as well as grants from the Regional Council of Burgundy. This work was also supported by the European Commission within EcoFINDERS project (FP7-264465).

© 2014 The Authors. *Microbial Biotechnology* published by John Wiley & Sons Ltd and Society for Applied Microbiology. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

2 S. Terrat et al.

In this context, a standardized 'ISO-11063: Soil quality – Method to directly extract DNA from soil' was developed and validated by independent laboratories to efficiently recover bacterial DNA from various soil samples (Philippot *et al.*, 2010; Petric *et al.*, 2011). However, archaeal and fungal groups also constitute a significant proportion of the soil microbial biodiversity and are key organisms for soil processes. In a previous study, we tested the sensitivity of the ISO-11063 method for the detection of these groups (Plassart *et al.*, 2012). Briefly, three different procedures were compared on five soils with contrasting land-use and physico-chemical properties: (i) the ISO-11063 standard; (ii) a modified ISO procedure (ISOm) that includes a particular mechanical lysis step (a FastPrep®-24 lysis step instead of the recommended bead beating using a mini bead-beater cell disruptor); and (iii) a custom procedure called GnS-GII, which also includes the FastPrep®-24 mechanical lysis step. This evaluation revealed that the ISO-11063 procedure yielded significantly less overall microbial DNA, (corroborated by measurement of the bacterial, archaeal and fungal densities by real-time PCR), whatever the soil is (Plassart *et al.*, 2012). Furthermore, the analysis of fungal communities' structure with terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) patterns showed that the two non-ISO methods clearly outperformed the ISO-11063 method, leading to more significant variations because of soil type and management. Finally, one major conclusion of this study was that the non-ISO methods provided a better representativeness of soil DNA mainly due to use of the FastPrep®-24 bead-beating system, achieving lysis of the majority of cells with tough walls and particularly fungal cells, more efficiently than the usual bead beating (Ranjard *et al.*, 2010; Rousk *et al.*, 2010; Yarwood *et al.*, 2010; Dequiedt *et al.*, 2011; Plassart *et al.*, 2012). Nevertheless, this comparative study was carried out using classical molecular approaches, i.e., quantitative PCR and community DNA fingerprinting through T-RFLP. Nowadays, high throughput sequencing technologies (e.g. 454 or Illumina) are readily available to assess microbial diversity with greater precision by obtaining hundreds of thousands of ribosomal rRNA gene sequences from a single metagenomic DNA (Roesch *et al.*, 2007; Will *et al.*, 2010; Maron *et al.*, 2011). Nonetheless, the DNA extraction techniques previously described has never been evaluated with these new technologies, in terms of efficiency and representativeness, despite their widespread use in soil microbial diversity studies.

In the present study, the same three DNA extraction procedures, coupled with high throughput sequencing technology, were evaluated to identify a technique suitable to characterize the diversity and composition of bacterial and fungal communities simultaneously. The guideline standard ISO-11063, the custom GnS-GII and a

custom DNA extraction procedure derived from the ISO-11063 standard (ISOm), were used to extract template DNA from five different soils with contrasting land-use and physico-chemical properties (Plassart *et al.*, 2012). A meta-barcoded pyrosequencing technique, targeting the 16S and 18S rRNA genes, was used to characterize bacterial and fungal communities' richness [based on the number of operational taxonomic units (OTUs) and genera detected], diversity (using Shannon and Evenness indices) and composition (taxonomic affiliation of OTUs). We also measured the phylogenetic distance between sets of OTUs in a phylogenetic tree using the UNIFRAC method to determine whether bacterial and fungal community compositions were influenced by the DNA extraction procedures.

Results and discussion

Since the development of molecular tools to study soil microbial communities, it has been largely demonstrated that the characterization of these communities might be influenced by the method used to recover soil metagenomic DNA (Delmont *et al.*, 2011b; Terrat *et al.*, 2012). It is consequently essential to test the representativeness of soil DNA extraction methods in terms of bacterial and fungal organisms, which constitute a major part of the soil microbial community. Here, the efficacy of three soil DNA extraction methods (ISO-11063, ISOm and GnS-GII) was assessed on five soils with different physico-chemical characteristics and land use (Table 1) using a meta-barcoded pyrosequencing technique targeting bacterial and fungal communities. This approach was chosen because it is a recently developed powerful technique widely used for detailed phylogenetic and taxonomic surveys of microbial communities (Roesch *et al.*, 2007; Rousk *et al.*, 2010; Will *et al.*, 2010; Lienhard *et al.*, 2013a).

Influence of soil DNA extraction procedure on bacterial richness and diversity

Bacterial rRNA gene sequences were successfully amplified by PCR and sequenced from all soils using each of the three DNA extraction procedures (Table 2). After bioinformatic filters, 2322 high-quality reads per sample were kept, analyzed and taxonomically identified using a curated database derived from SILVA (Quast *et al.*, 2013) (Table 3). Rarefaction curves of bacterial richness demonstrated that our sequencing depth allowed accurate description of the bacterial community diversity in each soil sample studied (Supporting Information Fig. S1).

No significant differences were found between the three DNA extraction methods for the number of bacterial genera detected, the number of bacterial OTUs or for the

Table 1. Origin, physical and chemical parameters of the five French soils used.

Soil	Collection site	Origin	Clay	Fine loam	Coarse loam	Fine sand	Coarse sand	Organic carbon	Total N	C/N	CaCO ₃	pH
C	Agricultural Site (Champdotre, Burgundy)	Crop soil	504	180	145	73	98	24.9	2.8	9	102	7.75
E	INRA Experimental Site (Epoisses, Burgundy)	Crop soil	392	320	228	34	26	16.5	1.65	10	2	7
F	Forest Observatory Plot (La Mailleraye-sur-Seine, Normandy)	Forest soil	101	167	205	217	310	103.3	3.1	34	< 1	3.8
L	INRA Experimental Site SOERE-ACBB (Lusignan, Poitou)	Grassland	175	369	304	73	79	13.2	1.33	9.92	< 1	6.6
R	INRA Experimental Site (Pierrelaye, Ile-de-France)	Crop soil	79	66	44	315	496	50.2	2.16	23.3	22	7.5

Clay, fine loam, coarse loam, fine sand and coarse sand, organic carbon, total N and calcium carbonate are given in mg g⁻¹. Originally published and extracted from (Plassart *et al.*, 2012).

Shannon and Evenness indices in any of the soils (Table 2). This means that neither the mechanical lysis step (using a mini bead-beater cell disruptor or the FastPrep®-24) nor the complete DNA extraction procedures had a significant effect on the evaluation of bacterial diversity parameters by meta-barcoding for the wide range of soil types and land uses tested (Table 1).

On the other hand, soil type did have an impact on bacterial richness and diversity indices, as significant differences were highlighted between soils, whatever the DNA extraction procedure (Table 2). Indeed, F and L soils (respectively the sandy acidic forest soil and the loamy grassland soil) were significantly different ($P < 0.001$) based on the number of OTUs, Shannon and Evenness indices. More precisely, the F soil had the lowest richness (number of OTUs and genera) and diversity, with for example a Shannon index of about 4.1 against 5.6 for the L soil (Table 2). This observation can be linked to particular physico-chemical characteristics, because the F soil had a pH of 3.8 and a C/N ratio of 34 (Dequiedt *et al.*, 2011; Lienhard *et al.*, 2013b). Several studies have high-

lighted that bacterial richness had a positive correlation with soil pH (Fierer and Jackson, 2006; Lauber *et al.*, 2008; Terrat *et al.*, 2012) and a negative correlation with C/N ratio (Kuramae *et al.*, 2012). Indeed, a high C/N ratio is generally typical of a large recalcitrant organic matter content that is unfavourable for bacterial growth (Boer *et al.*, 2005). However, the sandy crop soil R, also harbouring a C/N ratio of the same magnitude (23.3), holds a greater richness of OTUs and genera than the forest soil (Table 2). This might partly be due to either the high sand content (Table 1), which increases soil microscale heterogeneity and stimulates the bacterial richness (Chau *et al.*, 2011) or an alkaline pH (7.5) favouring bacterial richness (Fierer and Jackson, 2006; Lauber *et al.*, 2008; Terrat *et al.*, 2012).

Altogether, our results confirmed that bacterial diversity and richness can be strongly linked to soil characteristics and especially soil pH, organic matter and texture (Fierer and Jackson, 2006; Lauber *et al.*, 2008; Kuramae *et al.*, 2012; Terrat *et al.*, 2012; Lienhard *et al.*, 2013b). All DNA extraction procedures tested gave enough and similar

Table 2. Bacterial richness and diversity indices of the five soils used.

		Number of genera	OTUs (95% of similarity)	Shannon	Evenness
C	GnS	207.67 (± 5.73) 2	485.67 (± 49.13) 1,2	5.17 (± 0.13) 1,2	0.84 (± 0.01) 1,2
	ISO	207.33 (± 4.19) 1,2	524.33 (± 15.11) 1,2	5.15 (± 0.01) 1,2	0.82 (± 0.00) 1,2
	ISOm	205.50 (± 0.5) 1,2	521.5 (± 2.5) 1,2	5.24 (± 0.03) 1,2	0.84 (± 0.01) 1,2
E	GnS	205.67 (± 7.59) 2	522.67 (± 50.37) 1,2	5.16 (± 0.12) 1,2	0.82 (± 0.01) 1,2
	ISO	194.00 (± 5.89) 1,2	545.33 (± 31.48) 1,2	5.22 (± 0.06) 1,2	0.83 (± 0.00) 1,2
	ISOm	200.00 (± 7.48) 1,2	498.67 (± 21.64) 1,2	5.16 (± 0.02) 1,2	0.80 (± 0.00) 1,2
F	GnS	102.67 (± 11.14) 1	329.33 (± 50.31) 1	4.12 (± 0.26) 1	0.71 (± 0.03) 1
	ISO	111.00 (± 1.63) 1	358.33 (± 31.56) 1	4.33 (± 0.21) 1	0.74 (± 0.03) 1
	ISOm	97.33 (± 2.87) 1	281.33 (± 12.5) 1	3.99 (± 0.13) 1	0.71 (± 0.02) 1
L	GnS	234.33 (± 14.27) 1,2	658.3 (± 22.48) 2	5.58 (± 0.04) 2	0.86 (± 0.00) 2
	ISO	232.67 (± 2.87) 2	668.67 (± 38.69) 2	5.68 (± 0.06) 2	0.87 (± 0.00) 2
	ISOm	231.67 (± 11.09) 1,2	692 (± 50.34) 2	5.62 (± 0.09) 2	0.86 (± 0.01) 2
R	GnS	219.00 (± 9.80) 2	561.67 (± 72.67) 1,2	5.31 (± 0.15) 1,2	0.84 (± 0.01) 1,2
	ISO	223.33 (± 6.13) 2	653.33 (± 39.35) 1,2	5.63 (± 0.07) 1,2	0.87 (± 0.00) 1,2
	ISOm	231.00 (± 6.98) 2	653.67 (± 33.89) 1,2	5.5 (± 0.04) 1,2	0.85 (± 0.00) 1,2

The means were calculated with three replicates per soil (C, E, F, L and R) and procedure (ISO, ISOm and GnS-GII), and the standard errors of the means are indicated in parentheses. Significant differences between soils for the same procedure are indicated with numbers (1 – 1,2 – 2).

4 S. Terrat et al.

Table 3. Bioinformatic parameters and databases used in the analysis of bar-coded pyrosequencing results.

Step	Parameter	Targeted rDNA Gene	
		16S	18S
Preprocessing	Length threshold	370	300
	Number of ambiguities tolerated	0	0
	Detection of proximal primer sequence	Complete and perfect	Complete and perfect
Clustering	Detection of distal primer sequence	No	Perfect, but potentially incomplete
	Chosen level of similarity (%)	95	95
	Ignoring differences in homopolymer lengths	Yes	Yes
Filtering	Chosen clustering similarity threshold	95	95
	Used taxonomic database	SILVA (r114)	SILVA (r111)
	Chosen taxonomic level	Phylum	Phylum
Homogenization	Similarity or confidence threshold (%)	90	85
	High-quality reads kept for each sample	2322	4378
	Used taxonomic database	SILVA (r114)	SILVA (r111)
Taxonomy	Method or tool of comparison	USEARCH	MEGABLAST
	Similarity or confidence threshold (%)	80	80
	Chosen level of similarity (%)	95	95
Analysis	Ignoring differences in homopolymer lengths	Yes	Yes
	Computation of a UNIFRAC distance matrix	Yes	Yes

sensitivity to detect changes between indigenous bacterial communities of soils differing by their characteristics and management. These data also support the idea that a study limited to these diversity indices could not be sufficient to determine whether a DNA extraction procedure is more powerful than another to describe soil bacterial communities and that it might be completed by a more detailed bacterial community composition analysis.

Influence of soil DNA extraction procedure on fungal richness and diversity

Using the same DNA extracts as for the bacterial analysis (three DNA extraction procedures applied to five soils), 18S rRNA gene sequences were successfully amplified

and sequenced from all samples (Table 4). Homogenized high-quality reads (4378 per sample) were then analyzed using taxonomically dependent and independent analyses to determine fungal richness and diversity (Table 3). As for bacteria, the rarefaction curves of fungal richness confirmed that the number of high-quality reads allowed accurate description of the fungal community diversity in each soil sample studied (Supporting Information Fig. S1).

With regard to the number of detected genera, the numbers of OTUs and the computed indices (Shannon and Evenness), significant differences among the three DNA extraction procedures were recorded only for the L soil (Table 4), in which a lower number of fungal genera was significantly detected using the ISO procedure ($P = 0.003$). Moreover, in all the other soils but F, the

Table 4. Fungal richness and diversity indices of the five French soils used.

		Number of <i>genera</i>	OTUs (95% of similarity)	Shannon	Evenness
C	GnS	116.00 (± 11.43) 1	350.33 (± 42.32) 1,2	3.72 (± 0.05) 1,2	0.64 (± 0.01) 1,2
	ISO	92.33 (± 15.69) 1	273.67 (± 63.67) 1	3.31 (± 0.33) 1	0.59 (± 0.04) 1,2
	ISOm	118.67 (± 9.67) 1	340.67 (± 68.23) 1,2	3.73 (± 0.15) 1,2	0.64 (± 0.01) 1,2
E	GnS	128.00 (± 13.74) 1	287.33 (± 30.58) 1	3.39 (± 0.08) 1,2	0.6 (± 0.01) 1,2
	ISO	108.33 (± 9.81) 1	239.33 (± 31.54) 1	3.34 (± 0.22) 1	0.61 (± 0.03) 1,2
	ISOm	125.67 (± 6.55) 1	289 (± 33.66) 1	3.54 (± 0.18) 1,2	0.63 (± 0.02) 1,2
F	GnS	129.67 (± 8.34) 1	249.67 (± 11.15) 1	2.98 (± 0.05) 1	0.54 (± 0.01) 1
	ISO	136.00 (± 7.79) 2	312 (± 35.36) 1	3.19 (± 0.12) 1	0.56 (± 0.01) 1
	ISOm	140.33 (± 10.14) 1	267 (± 24.91) 1	3.27 (± 0.18) 1	0.59 (± 0.03) 1
L	GnS	127.33 (± 9.29) a.1	416.33 (± 89.46) 2	4.05 (± 0.21) 2	0.67 (± 0.01) 2
	ISO	89.67 (± 5.79) b.1	353.33 (± 51.45) 1	3.89 (± 0.09) 1	0.66 (± 0.03) 1,2
	ISOm	129.00 (± 6.48) a.1	382.33 (± 71.82) 2	3.74 (± 0.49) 2	0.63 (± 0.06) 2
R	GnS	141.33 (± 13.82) 1	407.33 (± 84.94) 2	3.9 (± 0.2) 1,2	0.65 (± 0.01) 1,2
	ISO	111.00 (± 11.00) 1,2	399.00 (± 30.00) 2	4.14 (± 0.01) 1	0.69 (± 0.01) 2
	ISOm	135.00 (± 12.68) 1	407 (± 67.38) 2	3.94 (± 0.12) 1,2	0.66 (± 0.01) 1,2

The means were calculated with three replicates per soil (C, E, F, L and R) and procedure (ISO, ISOm and GnS-GII), and the standard errors of the means are indicated in parentheses. Significant differences between procedures for the same soil are indicated by letters (a, b), and significant differences between soils for the same procedure are indicated with numbers (1 – 1,2 – 2).

number of genera recovered followed the same trend, with lower values detected for the ISO, than what was observed for the two other procedures. These genera missed by the ISO demonstrate that fungal diversity can be skewed using this procedure. As the main difference among the ISO and the two other procedures is the soil-grinding step; we can hypothesize that the traditional bead-beating system is not sufficient to lyse some fungal cells. Indeed, many fungi have cell walls that impede lysis and the recovery of nucleic acids (Fredricks *et al.*, 2005). The mechanical lysis step of the ISOM and GnS-GII procedures was strongly optimized in terms of type and size of the glass beads as well as in terms of the strength and duration of grinding using the FastPrep®-24 (Terrat *et al.*, 2012).

When fungal diversity was compared between soils, significant differences in the Shannon and Evenness indices ($P < 0.05$) and in the number of OTUs ($P < 0.1$) were observed whatever the DNA extraction procedure (Table 4). More precisely, the acidic forest soil F harboured the lowest richness and diversity, and the alkaline sandy crop soil R the highest (Table 4). These differences could be explained by several soil physico-chemical parameters, namely their contrasting pH (3.8 against 7.75), but also their C/N ratio (34 against 23.3) (Table 1). Although extreme environments like acidic soils may provide suitable biotopes for fungi (Baker and Banfield, 2003; Butinar *et al.*, 2005), the lowest richness and diversity was detected in the acidic forest soil F, indicating that other physico-chemical parameters can limit fungal communities. Thus, a high C/N ratio is typical of soil systems with a low rate of organic matter degradation because of the presence of a high proportion of recalcitrant organic matter (Kuramae *et al.*, 2012). Strickland and Rousk (2010) demonstrated in a previous study that the optimal C/N for fungi is expected to range from 5 to 15; i.e. closer to the C/N of the sandy crop soil R than to the ratio of the forest soil F, which has a higher carbon content. Focusing on the number of fungal genera recovered by the three DNA extraction procedures, only the ISO allowed the detection of significant differences between soils. This finding has to be seriously questioned because we demonstrated in the previous paragraph that the ISO underestimates the number of fungal genera.

Influence of soil DNA extraction procedure on bacterial community composition

The bacterial community composition in the five soils was compared by computing the UNIFRAC distances on a phylogenetic tree (Lozupone and Knight, 2005). In addition to analyzing the phylogenetic distances, we also compared the bacterial communities' compositions based on the relative abundance of the bacterial genera detected in

Meta-barcoded evaluation of the ISO-11063 standard 5

the samples (Fig. 1). Due to the size and variability of the genus table, only the most highly represented bacterial genera in the samples (i.e. only those for which the sum of the relative abundances of the genus in all samples was higher than 5%) were identified and mapped.

The clustering of soil bacterial communities indicated that replicates from the same soil were more similar to each other than replicates from other soils, whatever the DNA extraction procedure (Fig. 1). This observation demonstrated the good reproducibility between replicates for each type of soil DNA extraction procedure even if, surprisingly, two GnS-GII replicates from soils L and R seemed to be erroneously clustered. More precisely, two main clusters were identified, sorting the samples from the acidic forest soil F (which hosted a very different bacterial composition) apart from the four other soils (Fig. 1). Four sub-clusters could also be defined, each one grouping samples from each of the four soils and confirming that the studied soils hosted distinct bacterial communities, as already demonstrated by DNA fingerprinting approach (Plassart *et al.*, 2012). This observation demonstrated the good reproducibility between replicates for ISO and ISOM procedures. However, even if clustering revealed that soil type had a more important effect on bacterial composition than the DNA extraction procedure, it is interesting to note that this latter could induce significant variations (Fig. 1). For all soils (except the forest soil F), the bacterial diversity profiles resulting from the ISOM and GnS-GII DNA extraction procedures grouped together (i.e. were not discriminated by the UNIFRAC analysis), but were different from those obtained with the ISO-11063 procedure (Fig. 1). These observations confirm the influence of soil DNA extraction procedure on soil bacterial composition and especially the clear distinction between ISO-11063 and the two other procedures, potentially explained by differences in the soil-grinding methods (as discussed above for fungal richness and diversity). These differences were also confirmed by a more detailed analysis of bacterial composition (Fig. 1, subcells A–C). For example, the genus *Brevundimonas* was more detected ($P < 0.05$) with the ISO-11063 procedure than with the two others in the clayey crop soil C (Fig. 1, subcell A), as were the genera *Massilia*, *Pseudospirillum*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter*, *Thermomonas* and *Lysobacter*. Similarly, the genus *Polaromonas* was more detected in the sandy crop soil R (Fig. 1, subcell C), but not in the other soils. On the contrary, the genera *Clostridium*, *Nitrosospora*, *Microvirga* and *Pseudonocardia* were respectively less detected ($P < 0.05$) with ISO-11063 than with the ISOM and GnS-GII procedures in soils C, E, L and R (Fig. 1, subcell B). Because the genera *Clostridium* or *Pseudonocardia* are known to be potentially recalcitrant to mechanical lysis, because of their spore-forming ability (Kaewkla and Franco, 2011; Yang

6 S. Terrat et al.

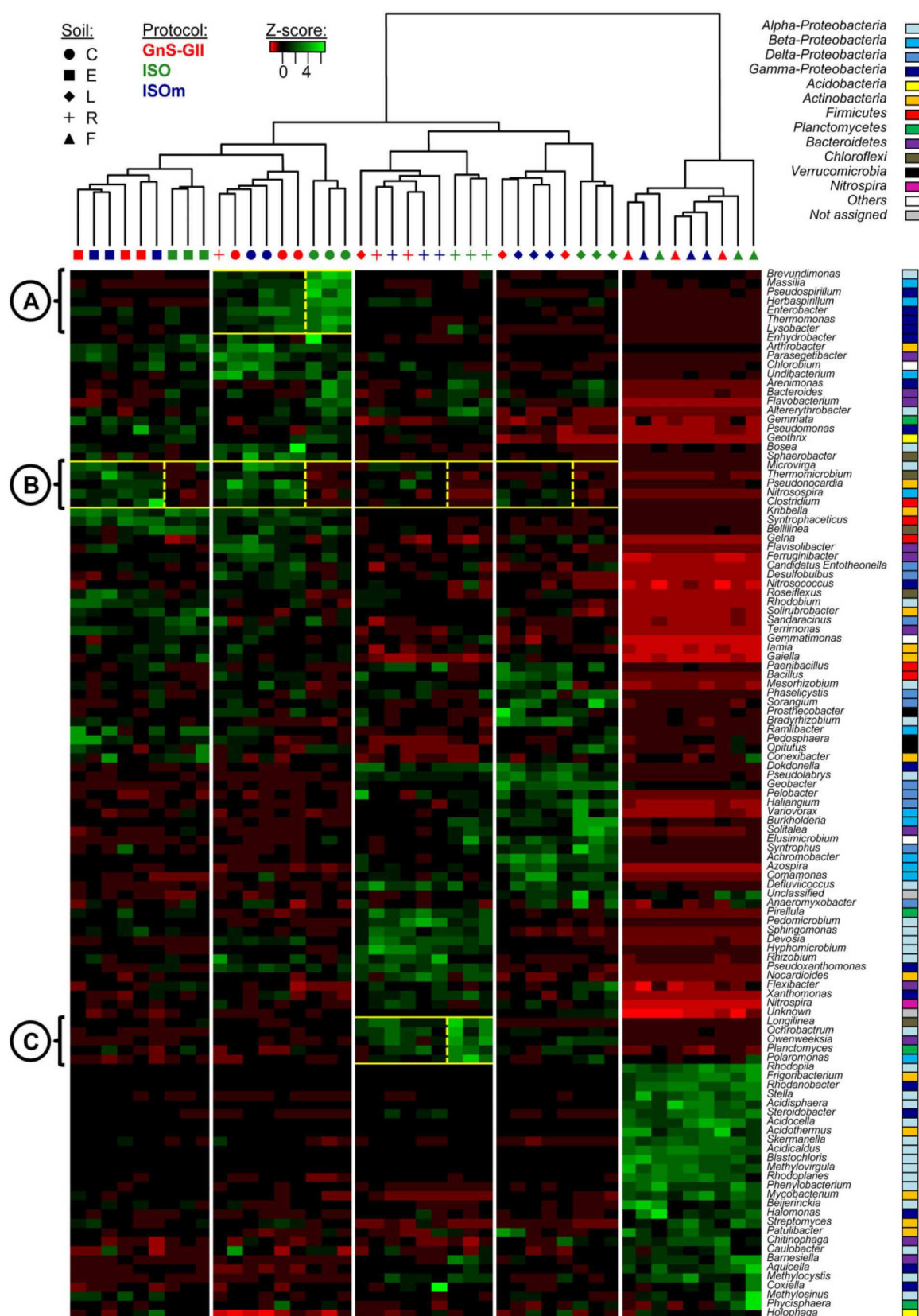


Fig. 1. Heat map comparison of the dominant bacterial genera detected in soils according to extraction procedures. The five different soils (C, E, F, L, R) were organized based on the UPGMA dendrogram of UNIFRAC distances (weighted and normalized) between soil samples according to the three DNA extraction procedures (ISO-11063, GnS-GII and ISOm). The legend shows the Z-scores (relative abundances are expressed as median centred Z-scores between all samples, and the colours scaled to standard deviations). Subcells A, B and C in the heat map have been highlighted by yellow squares and numbered to identify significant differences in the relative abundance of particular bacterial genera according to DNA extraction procedure.

and Ponce, 2011), their lower detection with the ISO-11063 procedure may be explained by the less efficient mechanical lysis (bead beating) of this procedure, compared with the two others, which are based on FastPrep®-24 grinding (Plassart *et al.*, 2012; Terrat *et al.*, 2012).

Influence of soil DNA extraction procedure on fungal community composition

As with the bacterial communities, the fungal communities' composition in all soils was compared by using the UNIFRAC distances and determining the most highly represented fungal genera in the samples (Fig. 2). The UNIFRAC dendrogram revealed a better discrimination of fungal composition between soils than between DNA extraction methods, demonstrating a good reproducibility between replicates for all procedures (Fig. 2). Moreover, as for the bacterial communities, the same clustering organization was obtained for fungal communities, revealing a significant distinction between the forest soil and the other soils. This observation corroborates other studies in which soil characteristics (e.g. pH, texture, C/N) were shown to impact fungal community diversity and composition (Rousk *et al.*, 2010; Strickland and Rousk, 2010; McGuire *et al.*, 2013). The fungal populations in this acidic soil clearly differed from those of the other soils, with a dominance of the *Basidiomycota* phylum (e.g. genera *Sebacina*, *Boletus*, *Pleurotus* or *Hericium*), which is common in forest soils (Buée *et al.*, 2009).

For soils F, L and R, the patterns of the fungal communities resulting from the ISO-11063 procedure were discriminated from those obtained with the two non-ISO protocols (Fig. 2). This observation evidenced that in these soils, the fungal community compositions detected with the ISO-11063 differed from those detected with the non-ISO procedures. More precisely, in the loamy grassland soil L, several genera (e.g. *Knufia* and *Diversispora*) were more detected ($P < 0.1$) with the ISO-11063 protocol (Fig. 2, subcell A). However, this positive impact of the ISO-11063 procedure was only visible for this particular soil. On the contrary, the genera *Myrothecium*, *Cryptococcus*, *Glomerella* and *Plectosphaerella* were respectively less detected ($P < 0.05$) with the ISO-11063 protocol than with the other methods in soils C, E, L and R (Fig. 2, subcell B), as *Pseudallescheria* in soils C, E and R, and *Hypocrea* in soils E and L ($P < 0.1$). This would be of great importance in ecological studies as some of these

genera (e.g. *Cryptococcus*, *Pseudallescheria*, *Hypocrea* and *Plectosphaerella*) are saprotrophic fungi known to play key roles in organic matter turnover (Martínez *et al.*, 2003; Jaklitsch *et al.*, 2005; Buée *et al.*, 2009; McGuire *et al.*, 2013). Moreover, the genus *Pseudallescheria*, which has been found in compost-amended or heavily hydrocarbon-polluted soils, can be used as an indicator of soil disturbance (April *et al.*, 1998). Therefore, the ISO-induced underrepresentation of these genera could lead to a misinterpretation of the functioning of an ecosystem.

This difference in community composition is, together with the lower number of fungal genera recovered with the ISO described earlier, a clue indicating that the ISO procedure may not be the most appropriate to investigate soil fungal communities. Besides, these differences are thought to be due to the less efficient mechanical lysis of soil with the ISO-11063 procedure; the classical system seems not to break open as many cells as the FastPrep®-24 bead-beating system, particularly in the case of fungal cells with tough walls. This is why the ISOm and GnS-GII methods are thought to be more efficient at extracting fungal DNA from different types of soils. This conclusion strengthens the idea that the physical lysis step is of crucial importance in a soil DNA extraction procedure (Feinstein *et al.*, 2009; İnceoğlu *et al.*, 2010; Delmont *et al.*, 2011b). This finding is in agreement with previous comparisons of these DNA extraction procedures based on quantitative PCR and community DNA fingerprinting (Plassart *et al.*, 2012).

Conclusion

In the context of modern microbial ecology, where investigations to describe the whole soil microbiota in numerous samples are carried out on a very large scale, the importance of using a single, standardized soil DNA extraction procedure is paramount. Among the three DNA extraction procedures evaluated in this study, the GnS-GII introduced some heterogeneity in bacterial composition between replicates, and the ISO-11063 DNA caused an underrepresentation of several fungal groups of ecological interest. Therefore, the ISOm procedure provides a better snapshot of bacterial and fungal communities.

Experimental procedures

Soil samples

Five soils were chosen for their contrasting land-use and physico-chemical characteristics (Table 1) (Plassart *et al.*,

8 S. Terrat et al.

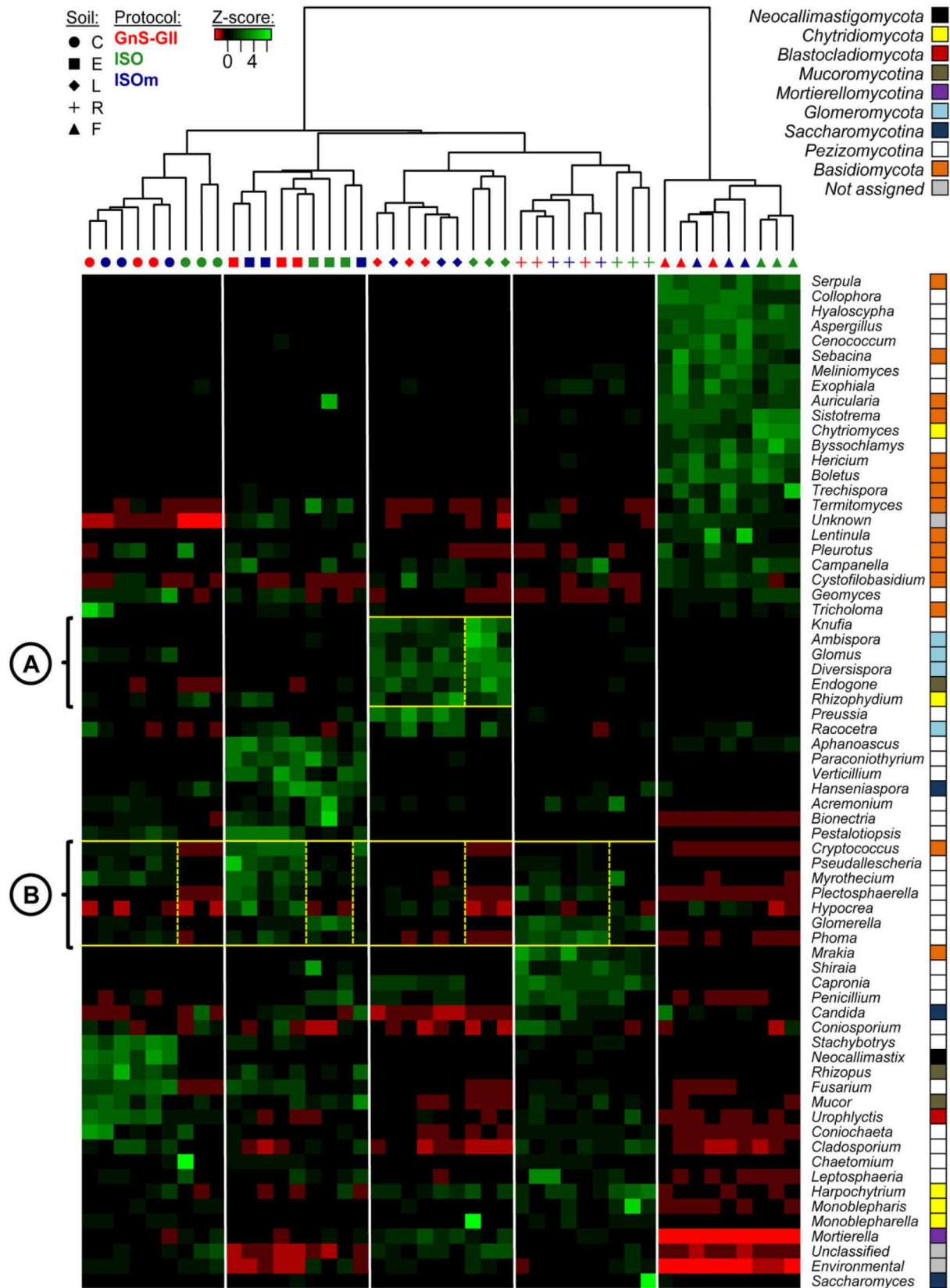


Fig. 2. Heat map comparison of the dominant fungal genera detected in soils according to extraction procedures. The five different soils (C, E, F, L, R) were organized based on the UPGMA dendrogram of UNIFRAC distances (weighted and normalized) between soil samples according to the three DNA extraction procedures (ISO-11063, GnS-GII and ISOm). The legend shows the Z-scores (relative abundances are expressed as median centred Z-scores between all samples, and the colours scaled to standard deviations). Subcells A and B in the heat map have been highlighted by yellow squares and numbered to identify significant differences in the relative abundance of particular fungal genera according to DNA extraction procedure.

2012). All necessary permits were obtained from the respective land owners (INRA, ADEME and private owners). For each soil, three independent replicates were collected at a depth of 20 cm [fully described in (Plassart *et al.*, 2012)]. Physico-chemical characteristics (pH, texture, organic carbon, total N and CaCO₃) were analyzed, using international standard procedures, by the Soil Analysis Laboratory at INRA (Arras, France, <http://www.lille.inra.fr/las>).

Soil DNA extraction, purification and quantification

Three different procedures were tested: the GnS-GII protocol, the ISO-11063 standard and the ISOm. All three procedures are adapted to extract DNA from 1 g of soil (dry weight) and have already been described by Plassart and colleagues (2012).

ISO-11063 procedure. This protocol is a version of the ISO-11063 standard (Martin-Laurent *et al.*, 2001; Petric *et al.*, 2011). Soil was added to a bead-beating tube containing 2 g of glass beads of 106 µm diameter and eight glass beads of 2 mm diameter. Each soil sample was mixed with a solution of 100 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM EDTA (pH 8), 100 mM NaCl, 2% (w/v) polyvinylpyrrolidone (40 g mol⁻¹) and 2% (w/v) sodium dodecyl sulfate. The tubes were then shaken for 30 s at 1600 r.p.m. in a mini bead-beater cell disruptor (Mikro-Dismembrator, Braun Biotech International), then incubated for 10 min at 70°C and centrifuged at 14,000g for 1 min. After removing the supernatant, proteins were precipitated, with 1/10 volume of 3 M sodium acetate prior to centrifugation (14,000g for 5 min at 4°C). Finally, nucleic acids were precipitated by adding 1 volume of ice-cold isopropanol. The DNA pellets obtained after centrifugation (14,000g for 5 min at 4°C) were washed with 70% ethanol (full details are described in (Martin-Laurent *et al.*, 2001; Philippot *et al.*, 2010; Petric *et al.*, 2011)).

ISOm procedure. This protocol is a modified version of ISO-11063 standard as it includes a different mechanical lysis step (FastPrep® bead-beating instead of the recommended bead beating). Soil was added to 15 ml of Falcon tube containing 2.5 g of 1.4 mm diameter ceramic beads, 2 g of 106 µm diameter silica beads and four glass beads of 4 mm diameter. Each soil sample was mixed with a solution of 100 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM EDTA (pH 8), 100 mM NaCl, 2% (w/v) polyvinylpyrrolidone (40 g mol⁻¹) and 2% (w/v) sodium dodecyl sulfate. The tubes were then shaken for 3 × 30 s at 4 m sec⁻¹ in a FastPrep®-24 (MP-Biomedicals, NY, USA), before incubation for 10 min at 70°C and centrifugation at 14,000g for 1 min. After removing the supernatant, proteins were precipitated with 1/10 volume of 3 M sodium acetate prior to centrifugation (14,000g for 5 min at 4°C). Finally, nucleic acids were precipitated by adding 1 volume of ice-

cold isopropanol. The DNA pellets obtained after centrifugation (14,000g for 5 min at 4°C) were washed with 70% ethanol.

GnS-GII procedure. This DNA extraction procedure was initially developed and optimized by the GenoSol platform (Terrat *et al.*, 2012). Soil was added to 15 ml of Falcon tube containing 2.5 g of 1.4 mm diameter ceramic beads, 2 g of 106 µm diameter silica beads and four glass beads of 4 mm diameter. Each soil sample was mixed with a solution of 100 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM EDTA (pH 8), 100 mM NaCl, 2% (w/v) and 2% (w/v) sodium dodecyl sulfate. The tubes were then shaken for 3 × 30 s at 4 m sec⁻¹ in a FastPrep®-24 (MP-Biomedicals, NY, USA), before incubation for 30 min at 70°C and centrifugation at 7,000g for 5 min at 20°C. After removing the supernatant, proteins were precipitated with 1/10 volume of 3 M sodium acetate prior to centrifugation (14,000g for 5 min at 4°C). Finally, nucleic acids were precipitated by adding 1 volume of ice-cold isopropanol. The DNA pellets obtained after centrifugation (14,000g for 5 min at 4°C) were washed with 70% ethanol.

Purification and quantification procedure. As the DNA purification step is not part of the evaluated protocols to avoid additional biases among the three procedures and only compare the extraction step, all crude soil DNA extracts were purified and quantified using the same procedure (Ranjard *et al.*, 2003; Plassart *et al.*, 2012). Briefly, 100 µl aliquots of crude DNA extracts were loaded onto PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) Microbiospin minicolumns (Bio-Rad) and centrifuged for 4 min at 1000g and 10°C. Eluates were then collected and purified for residual impurities using the GeneClean Turbo kit (MP-Biomedicals, NY, USA). Purified DNA extracts were quantified using the PicoGreen staining Kit (Molecular Probes, Paris, France).

Pyrosequencing of 16S and 18S rRNA gene sequences

Microbial diversity was determined for each biological replicate and for each soil (C, F, E, L and R) by 454 pyrosequencing of ribosomal genes. A 16S rRNA gene fragment with sequence variability and appropriate size (about 450 bases) for 454 pyrosequencing was amplified using the primers F479 (5'-CAGCMGCYGCNGTAANAC-3') and R888 (5'-CCGYCAATTCMTTTRAGT-3') (Supporting Information Table S1 for *in silico* match analysis, Terrat *et al.* 2014). For each sample, 5 ng of DNA were used for a 25 µl of PCR conducted under the following conditions: 94°C for 2 min, 35 cycles of 30 s at 94°C, 52°C for 30 s and 72°C for 1 min, followed by 7 min at 72°C. The PCR products were purified using a MinElute gel extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and quantified using the PicoGreen staining Kit (Molecular Probes, Paris, France). Similarly, an 18S rRNA gene fragment of about 350 bases was amplified using the

10 S. Terrat et al.

primers FR1 (5'-ANCCATTCAATCGGTANT-3') and FF390 (5'-CGATAACGAACGAGACCT-3') (Prevost-Boure *et al.*, 2011) under the following PCR conditions: 94°C for 3 min, 35 cycles of 1 min at 94°C, 52°C for 1 min and 72°C for 1 min, followed by 5 min at 72°C. A second PCR of nine cycles was then conducted twice for each sample under similar PCR conditions with purified PCR products and 10 base pair multiplex identifiers added to the primers at 5' position to specifically identify each sample and avoid PCR bias. Finally, the duplicate PCR products were pooled, purified and quantified as previously described. Pyrosequencing was then carried out on a GS FLX Titanium (Roche 454 Sequencing System) by Genoscreen (Lille, France).

Bioinformatic analysis of 16S and 18S rRNA gene sequences

Bioinformatic analyses were done using the GnS-PIPE initially developed by the Genosol platform (INRA, Dijon, France) (Terrat *et al.*, 2012) and recently optimized. The parameters chosen for each bioinformatic step can be found in Table 3. First, all the 16S and 18S raw reads were sorted according to the multiplex identifier sequences. The raw reads were then filtered and deleted based on (i) their length, (ii) their number of ambiguities (Ns) and (iii) their primer(s) sequence(s). A PERL program was then applied for rigorous dereplication (i.e. clustering of strictly identical sequences). The dereplicated reads were then aligned using INFERNAL alignment (Cole *et al.*, 2009), and clustered into OTU using a PERL program that groups rare reads to abundant ones, and does not count differences in homopolymer lengths. A filtering step was then carried out to check all single singletons (reads detected only once and not clustered, which might be artefacts, such as PCR chimeras) based on the quality of their taxonomic assignments. Finally, in order to compare the data sets efficiently and avoid biased community comparisons, the reads retained were homogenized by random selection closed to the lowest dataset.

The retained high-quality reads were used for (i) taxonomy-independent analyses, determining several diversity and richness indices using the defined OTU composition at the genus level and (ii) taxonomy-based analysis using similarity approaches against dedicated reference databases from SILVA (Quast *et al.*, 2013) (see Table 3). The raw data sets are available on the European Bioinformatics Institute database system under project accession number PRJEB4825.

Statistical analyses

The effects of the DNA extraction procedure on bacterial and fungal diversities were tested by analysis of variance (multiple paired comparisons). The effects of the DNA extraction procedure on bacterial and fungal community compositions were assessed by Kruskal–Wallis tests. All statistical analyses were performed under XLSTAT software (Addinsoft®). The bacterial and fungal communities from all samples were also compared by using UNIFRAC (Lozupone and Knight, 2005), based on the 16S and 18S phylogenetic trees computed with FASTTREE (Price *et al.*, 2010).

Acknowledgements

Thanks to the National Research Infrastructure 'Agro-écosystèmes, Cycles Biogéochimique et Biodiversité' (SOERE-ACBB <http://www.soere-acbb.com/fr/>) for providing support during the sampling campaign and making available the physico-chemical soil properties data. The funders [National Agency for Research (through 'Investments for the Future' program), Regional Council of Burgundy and European Commission) had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflict of Interest

None declared.

References

- April, T.M., Abbott, S.P., Foght, J.M., and Currah, R.S. (1998) Degradation of hydrocarbons in crude oil by the ascomycete *Pseudallescheria boydii* (Microasaceae). *Can J Microbiol* **44**: 270–278.
- Baker, B.J., and Banfield, J.F. (2003) Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiol Ecol* **44**: 139–152.
- Boer, W.d., Folman, L.B., Summerbell, R.C., and Boddy, L. (2005) Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 795–811.
- Buée, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R.H., Uroz, S., and Martin, F. (2009) 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytol* **184**: 449–456.
- Butinar, L., Santos, S., Spencer-Martins, I., Oren, A., and Gunde-Cimerman, N. (2005) Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiol Lett* **244**: 229–234.
- Chau, J.F., Bagtzoglou, A.C., and Willig, M.R. (2011) The effect of soil texture on richness and diversity of bacterial communities. *Environ Forensics* **12**: 333–341.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., *et al.* (2009) The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* **37**: D141–D145.
- Delmont, T.O., Robe, P., Cecillon, S., Clark, I.M., Constancias, F., Simonet, P., *et al.* (2011a) Accessing the soil metagenome for studies of microbial diversity. *Appl Environ Microbiol* **77**: 1315–1324.
- Delmont, T.O., Robe, P., Clark, I., Simonet, P., and Vogel, T.M. (2011b) Metagenomic comparison of direct and indirect soil DNA extraction approaches. *J Microbiol Methods* **86**: 397–400.
- Dequiedt, S., Saby, N.P.A., Lelievre, M., Jolivet, C., Thioulouse, J., Toutain, B., *et al.* (2011) Biogeographical patterns of soil molecular microbial biomass as influenced by soil characteristics and management. *Glob Ecol Biogeogr* **20**: 641–652.
- Feinstein, L.M., Sul, W.J., and Blackwood, C.B. (2009) Assessment of bias associated with incomplete extraction of microbial DNA from soil. *Appl Environ Microbiol* **75**: 5428–5433.

- Fierer, N., and Jackson, R.B. (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 626–631.
- Fredricks, D.N., Smith, C., and Meier, A. (2005) Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR comparison of six DNA extraction methods for recovery of Fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *J Clin Microbiol* **43**: 5122–5128.
- İnceoğlu, Ö., Hoogwout, E.F., Hill, P., and van Elsas, J.D. (2010) Effect of DNA extraction method on the apparent microbial diversity of soil. *Appl Environ Microbiol* **76**: 3378–3382.
- Jaklitsch, W.M., Komon, M., Kubicek, C.P., and Druzhinina, I.S. (2005) *Hypocrea voglmayrii* sp. nov. from the Austrian Alps represents a new phylogenetic clade in *Hypocrea/Trichoderma*. *Mycol* **97**: 1365–1378.
- Kaewkla, O., and Franco, C.M.M. (2011) *Pseudonocardia eucalypti* sp. nov., an endophytic actinobacterium with a unique knobby spore surface, isolated from roots of a native Australian eucalyptus tree. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 742–746.
- Kuramae, E.E., Yergeau, E., Wong, L.C., Pijl, A.S., van Veen, J.A., and Kowalchuk, G.A. (2012) Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. *FEMS Microbiol Ecol* **79**: 12–24.
- Lauber, C.L., Strickland, M.S., Bradford, M.A., and Fierer, N. (2008) The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biol Biochem* **40**: 2407–2415.
- Lienhard, P., Terrat, S., Mathieu, O., Levêque, J., Prévost-Bouré, N.C., Nowak, V., et al. (2013a) Soil microbial diversity and C turnover modified by tillage and cropping in Laos tropical grassland. *Environ Chem Lett* **11**: 1–8.
- Lienhard, P., Tivet, F., Chabanne, A., Dequiedt, S., Lelievre, M., Sayphoummie, S., et al. (2013b) No-till and cover crops shift soil microbial abundance and diversity in Laos tropical grasslands. *Agron Sustain Dev* **33**: 375–384.
- Lozupone, C., and Knight, R. (2005) UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8228–8235.
- McGuire, K.L., Payne, S.G., Palmer, M.I., Gillikin, C.M., Keefe, D., Kim, S.J., et al. (2013) Digging the New York City skyline: soil fungal communities in green roofs and city parks. *PLoS ONE* **8**: e58020.
- Maron, P.-A., Mougel, C., and Ranjard, L. (2011) Soil microbial diversity: methodological strategy, spatial overview and functional interest. *C R Biol* **334**: 403–411.
- Martínez, M., López-Solanilla, E., Rodríguez-Palenzuela, P., Carbonero, P., and Díaz, I. (2003) Inhibition of plant-pathogenic fungi by the barley cystatin Hv-CPI (Gene Icy) is not associated with its cysteine-proteinase inhibitory properties. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 876–883.
- Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J.C., Soulas, G., and Catroux, G. (2001) DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2354–2359.
- Petric, I., Philippot, L., Abbate, C., Bispo, A., Chesnot, T., Hallin, S., et al. (2011) Inter-laboratory evaluation of the ISO standard 11063 'Soil quality – Method to directly extract DNA from soil samples'. *J Microbiol Methods* **84**: 454–460.
- Philippot, L., Abbate, C., Bispo, A., Chesnot, T., Hallin, S., Lemanceau, P., et al. (2010) Soil microbial diversity: an ISO standard for soil DNA extraction. *J Soils Sediments* **10**: 1344–1345.
- Plassart, P., Terrat, S., Thomson, B., Griffiths, R., Dequiedt, S., Lelievre, M., et al. (2012) Evaluation of the ISO standard 11063 DNA extraction procedure for assessing soil microbial abundance and community structure. *PLoS ONE* **7**: e44279.
- Prevost-Boure, N.C., Christen, R., Dequiedt, S., Mougel, C., Lelievre, M., Jolivet, C., et al. (2011) Validation and application of a PCR primer set to quantify fungal communities in the soil environment by real-time quantitative PCR. *PLoS ONE* **6**: e24166.
- Price, M.N., Dehal, P.S., and Arkin, A.P. (2010) FastTree 2 – approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS ONE* **5**: e9490.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., et al. (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* **41**: D590–D596.
- Rajendhran, J., and Gunasekaran, P. (2008) Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. *Biotechnol Adv* **26**: 576–590.
- Ranjard, L., Lejon, D.P.H., Mougel, C., Schehrer, L., Merdinoglu, D., and Chaussod, R. (2003) Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environ Microbiol* **5**: 1111–1120.
- Ranjard, L., Dequiedt, S., Jolivet, C., Saby, N.P.A., Thioulouse, J., Harmand, J., et al. (2010) Biogeography of soil microbial communities: a review and a description of the ongoing French national initiative. *Agron Sustain Dev* **30**: 359–365.
- Roesch, L.F.W., Fulthorpe, R.R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A.K.M., Kent, A.D., et al. (2007) Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J* **1**: 283–290.
- Rousk, J., Baath, E., Brookes, P.C., Lauber, C.L., Lozupone, C., Caporaso, J.G., et al. (2010) Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME J* **4**: 1340–1351.
- Strickland, M.S., and Rousk, J. (2010) Considering fungal: bacterial dominance in soils – methods, controls, and ecosystem implications. *Soil Biol Biochem* **42**: 1385–1395.
- Terrat, S., Christen, R., Dequiedt, S., Lelievre, M., Nowak, V., Regnier, T., et al. (2012) Molecular biomass and MetaTaxogenomic assessment of soil microbial communities as influenced by soil DNA extraction procedure. *Microb Biotechnol* **5**: 135–141.
- Terrat, S., Dequiedt, S., Horigue, W., Lelievre, M., Cruaud, C., Saby, N., et al. (2014) Improving soil bacterial taxonomic relationships assessment using DNA meta-barcoding. *Heredity*. In press.
- Will, C., Thürmer, A., Wollherr, A., Nacke, H., Herold, N., Schumpf, M., et al. (2010) Horizon-specific bacterial community composition of German grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* **76**: 6751–6759.

12 S. Terrat et al.

- Yang, W.-W., and Ponce, A. (2011) Validation of a *Clostridium* endospore viability assay and analysis of Greenland ices and Atacama desert soils. *Appl Environ Microbiol* **77**: 2352–2358.
- Yarwood, S., Bottomley, P., and Myrold, D. (2010) Soil microbial communities associated with Douglas-fir and red alder stands at high- and low-productivity forest sites in Oregon, USA. *Microb Ecol* **60**: 606–617.
- Zhou, J., Bruns, M.A., and Tiedje, J.M. (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* **62**: 316–322.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Fig. S1. Rarefaction curves of bacterial and fungal OTUs detected in soils according to extraction procedures.

Table S1. Detailed hit frequencies (%) of the in silico analysis of the F479/R888 primer set for Bacteria, Archaea and Eukaryota.

Fig. S1. Rarefaction curves of bacterial and fungal OTUs detected in soils according to extraction procedures. Each plot represents the three replicates of each DNA extraction procedure (ISO-11063 in green, GnS-GII in red and ISOm in blue) for a given soil (C, E, F, L or R).

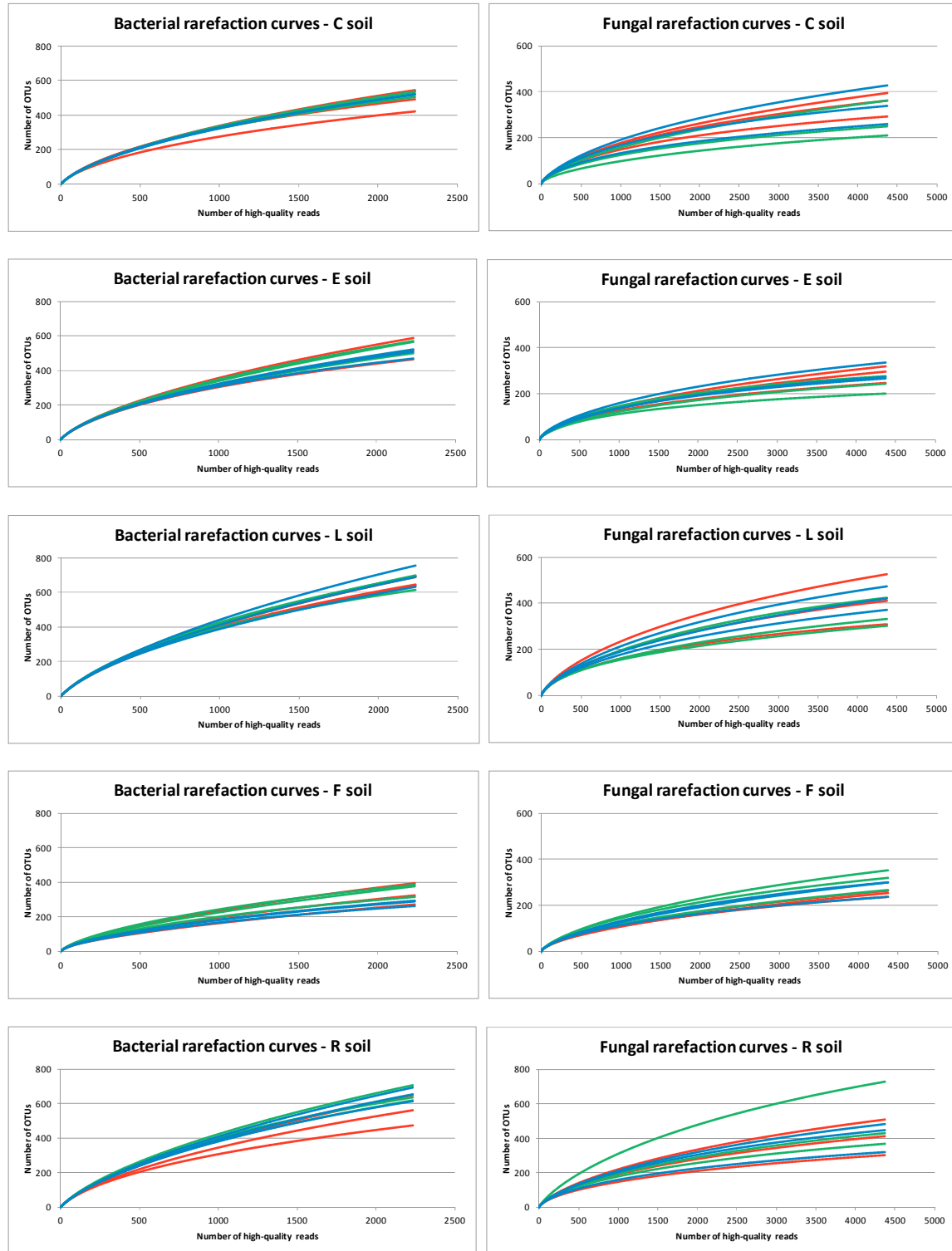


Table S1. Detailed hit frequencies (%) of the *in silico* analysis of the F479/R888 primer set for Bacteria, Archaea, and Eukaryota. The analysis allowed k mismatches, k ranging from 0 (original primer set sequences) to 1 (test of primer set sequences with one tolerated mismatch). The sequences investigated were SILVA, and direct extraction of every SSU rRNA sequence from EMBL using acnuc, and also a dedicated reference database of 18S eukaryotic sequences which have been thoroughly analyzed and annotated.

Origin	Phylum	Class	Total number of sequences	Matched sequences		Hit frequencies (%)	
				k = 0	k = 1	k = 0	k = 1
Chloroplast	Cyanobacteria	Chloroplast	4389	4036	4248	92	96,8
Mitochondria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	567	347	389	61,2	68,6
Archaea	Crenarchaeota	AK31	31	30	30	96,8	96,8
Archaea	Crenarchaeota	AK56	10	9	9	90	90
Archaea	Crenarchaeota	AK59	63	56	58	88,9	92,1
Archaea	Crenarchaeota	AK8	11	8	9	72,7	81,8
Archaea	Crenarchaeota	D-F10	15	12	13	80	86,7
Archaea	Crenarchaeota	FS243A-60	10	9	10	90	100
Archaea	Crenarchaeota	OPPD003	7	7	7	100	100
Archaea	Crenarchaeota	Papm3A43	2	2	2	100	100
Archaea	Crenarchaeota	TOTO-A6-15	3	3	3	100	100
Archaea	Crenarchaeota	Thermoprotei	1045	936	1007	89,6	96,4
Archaea	Crenarchaeota	Z273FA48	2	1	2	50	100
Archaea	Crenarchaeota	pMC2A209	5	2	2	40	40
Archaea	Crenarchaeota	pSLI2	13	13	13	100	100
Archaea	Euryarchaeota	Archaeoglobi	115	104	112	90,4	97,4
Archaea	Euryarchaeota	Halobacteria	3742	2865	3475	76,6	92,9
Archaea	Euryarchaeota	Methanobacteria	1557	1439	1503	92,4	96,5
Archaea	Euryarchaeota	Methanococci	141	124	133	87,9	94,3
Archaea	Euryarchaeota	Methanomicrobia	5358	4898	5148	91,4	96,1
Archaea	Euryarchaeota	Methanopyri	13	0	13	0	100
Archaea	Euryarchaeota	Thermococci	386	334	346	86,5	89,6
Archaea	Euryarchaeota	Thermoplasmata	4068	3238	3809	79,6	93,6
Archaea	Euryarchaeota	pCIRA-13	3	2	3	66,7	100
Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteria	8048	7604	7907	94,5	98,2
Bacteria	Acidobacteria	Holophagae	953	899	935	94,3	98,1
Bacteria	Acidobacteria	RB25	279	267	277	95,7	99,3
Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiia	3783	1902	3705	50,3	97,9
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	33891	29468	33349	86,9	98,4
Bacteria	Actinobacteria	Coriobacteria	1759	1613	1712	91,7	97,3
Bacteria	Actinobacteria	FFCH16263	2	2	2	100	100
Bacteria	Actinobacteria	KIST-JY010	3	3	3	100	100
Bacteria	Actinobacteria	MB-A2-108	199	185	192	93	96,5
Bacteria	Actinobacteria	Nitriiruptoria	91	88	90	96,7	98,9
Bacteria	Actinobacteria	OPB41	90	82	86	91,1	95,6
Bacteria	Actinobacteria	Rubrobacteria	234	35	217	15	92,7
Bacteria	Actinobacteria	TakashiAC-B11	16	16	16	100	100
Bacteria	Actinobacteria	Thermoleophilina	1113	1049	1093	94,2	98,2
Bacteria	Aquificae	Aquificae	890	793	870	89,1	97,8
Bacteria	Armatimonadetes	Armatimonadia	144	122	141	84,7	97,9
Bacteria	Bacteroidetes	AMV16	16	16	16	100	100
Bacteria	Bacteroidetes	BD2-2	214	193	204	90,2	95,3
Bacteria	Bacteroidetes	BSV13	49	48	49	98	100
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	45142	42677	44306	94,5	98,1
Bacteria	Bacteroidetes	Cytophagia	3610	3204	3550	88,8	98,3
Bacteria	Bacteroidetes	DUNssu192	4	4	4	100	100
Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	9328	8801	9109	94,4	97,7
Bacteria	Bacteroidetes	Ika33	8	8	8	100	100
Bacteria	Bacteroidetes	ML602M-17	11	11	11	100	100
Bacteria	Bacteroidetes	SB-1	186	172	182	92,5	97,8
Bacteria	Bacteroidetes	SB-5	92	87	90	94,6	97,8
Bacteria	Bacteroidetes	SM1A07	16	13	16	81,3	100
Bacteria	Bacteroidetes	Sphingobacteria	5252	4926	5131	93,8	97,7
Bacteria	Bacteroidetes	WCHB1-32	65	63	64	96,9	98,5
Bacteria	Bacteroidetes	vadinHA17	442	406	429	91,9	97,1
Bacteria	Caldiserica	Caldiserica	98	5	96	5,1	98
Bacteria	Chlamydiae	Chlamydiae	359	4	352	1,1	98,1
Bacteria	Chlorobi	Chlorobia	632	286	619	45,3	97,9
Bacteria	Chlorobi	Ignavibacteria	317	300	310	94,6	97,8
Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	5618	1940	4730	34,5	84,2
Bacteria	Chloroflexi	Caldilineae	836	661	810	79,1	96,9
Bacteria	Chloroflexi	Chloroflexi	351	319	338	90,9	96,3
Bacteria	Chloroflexi	Dehalococcoidetes	205	187	195	91,2	95,1
Bacteria	Chloroflexi	Elev-1554	11	7	11	63,6	100
Bacteria	Chloroflexi	FS117-23B-02	16	14	14	87,5	87,5

Chapitre II. Standardisation de deux bioindicateurs microbiens

Bacteria	Chloroflexi	FS118-62B-02	43	37	42	86	97,7
Bacteria	Chloroflexi	FW22	32	29	30	90,6	93,8
Bacteria	Chloroflexi	GIF3	46	38	46	82,6	100
Bacteria	Chloroflexi	GIF9	86	81	84	94,2	97,7
Bacteria	Chloroflexi	Gitt-GS-136	40	39	40	97,5	100
Bacteria	Chloroflexi	JG30-KF-CM66	102	99	102	97,1	100
Bacteria	Chloroflexi	JG37-AG-4	127	42	125	33,1	98,4
Bacteria	Chloroflexi	KD4-96	87	80	84	92	96,6
Bacteria	Chloroflexi	KZNMV-5-B42	2	2	2	100	100
Bacteria	Chloroflexi	Ktedonobacteria	376	353	371	93,9	98,7
Bacteria	Chloroflexi	MSB-5B2	8	7	8	87,5	100
Bacteria	Chloroflexi	Napoli-4B-65	24	22	24	91,7	100
Bacteria	Chloroflexi	P2-11E	28	23	27	82,1	96,4
Bacteria	Chloroflexi	S085	137	129	134	94,2	97,8
Bacteria	Chloroflexi	SHA-26	28	25	28	89,3	100
Bacteria	Chloroflexi	Sh765B-AG-111	94	93	94	98,9	100
Bacteria	Chloroflexi	TK10	152	144	150	94,7	98,7
Bacteria	Chloroflexi	Thermomicrobia	132	129	131	97,7	99,2
Bacteria	Chloroflexi	vadinBA26	169	150	166	88,8	98,2
Bacteria	Chrysiogenetes	Chrysiogenetes	9	7	8	77,8	88,9
Bacteria	Cyanobacteria	4C0d-2	202	188	199	93,1	98,5
Bacteria	Cyanobacteria	Acaryochloris	15	14	14	93,3	93,3
Bacteria	Cyanobacteria	Brasilonema	12	10	10	83,3	83,3
Bacteria	Cyanobacteria	Chroogloeocystis	4	4	4	100	100
Bacteria	Cyanobacteria	ML635J-21	100	91	100	91	100
Bacteria	Cyanobacteria	MLE1-12	78	75	77	96,2	98,7
Bacteria	Cyanobacteria	Mastigocladopsis	7	7	7	100	100
Bacteria	Cyanobacteria	Merismopedia	16	16	16	100	100
Bacteria	Cyanobacteria	QB36	2	2	2	100	100
Bacteria	Cyanobacteria	SHA-109	131	117	129	89,3	98,5
Bacteria	Cyanobacteria	SM1D11	29	29	29	100	100
Bacteria	Cyanobacteria	SM2F09	11	11	11	100	100
Bacteria	Cyanobacteria	Snowella	7	7	7	100	100
Bacteria	Cyanobacteria	SubsectionI	2810	2631	2724	93,6	96,9
Bacteria	Cyanobacteria	SubsectionII	186	165	177	88,7	95,2
Bacteria	Cyanobacteria	SubsectionIII	1770	1699	1737	96	98,1
Bacteria	Cyanobacteria	SubsectionIV	1371	1319	1350	96,2	98,5
Bacteria	Cyanobacteria	SubsectionV	101	95	98	94,1	97
Bacteria	Cyanobacteria	WD272	54	54	54	100	100
Bacteria	Deferribacteres	Deferribacteres	1462	1403	1444	96	98,8
Bacteria	Deinococcus-Thermus	Deinococci	879	811	864	92,3	98,3
Bacteria	Dictyoglomi	Dictyoglomia	27	25	26	92,6	96,3
Bacteria	Elusimicrobia	Elusimicrobia	312	275	303	88,1	97,1
Bacteria	Fibrobacteres	Fibrobacteria	997	930	989	93,3	99,2
Bacteria	Firmicutes	Bacillales	1	0	0	0	0
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	50612	47050	49319	93	97,4
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	107605	99406	105039	92,4	97,6
Bacteria	Firmicutes	Erysipelotrichi	7251	6151	7047	84,8	97,2
Bacteria	Firmicutes	Lactobacillales	2	0	0	0	0
Bacteria	Fusobacteria	Fusobacteria	1706	1545	1618	90,6	94,8
Bacteria	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	1461	1370	1427	93,8	97,7
Bacteria	Lentisphaerae	Lentisphaeria	1033	466	988	45,1	95,6
Bacteria	Nitrospirae	Nitrospira	2198	2023	2139	92	97,3
Bacteria	Planctomycetes	028H05-P-BN-P5	12	10	12	83,3	100
Bacteria	Planctomycetes	BD7-11	59	58	59	98,3	100
Bacteria	Planctomycetes	C47	3	3	3	100	100
Bacteria	Planctomycetes	MBMPE71	13	10	12	76,9	92,3
Bacteria	Planctomycetes	MD2896-B258	7	6	6	85,7	85,7
Bacteria	Planctomycetes	OM190	262	196	257	74,8	98,1
Bacteria	Planctomycetes	Phycisphaerae	1173	937	1141	79,9	97,3
Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetacia	3726	2884	3625	77,4	97,3
Bacteria	Planctomycetes	SGST604	2	2	2	100	100
Bacteria	Planctomycetes	vadinHA49	75	60	73	80	97,3
Bacteria	Proteobacteria	ARKDMS-49	17	17	17	100	100
Bacteria	Proteobacteria	ARKICE-90	48	43	47	89,6	97,9
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	46598	43100	45744	92,5	98,2
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	34843	33055	34180	94,9	98,1
Bacteria	Proteobacteria	CF2	67	66	67	98,5	100
Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	13429	10952	13144	81,6	97,9
Bacteria	Proteobacteria	Elev-16S-509	31	27	31	87,1	100
Bacteria	Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	4861	49	4672	1	96,1

Chapitre II. Standardisation de deux bioindicateurs microbiens

Bacteria	Proteobacteria	FGL7S	6	5	6	83,3	100
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	89316	84731	87512	94,9	98
Bacteria	Proteobacteria	JTB23	122	113	117	92,6	95,9
Bacteria	Proteobacteria	MACA-EFT26	5	5	5	100	100
Bacteria	Proteobacteria	Milano-WF1B-44	23	21	23	91,3	100
Bacteria	Proteobacteria	SC3-20	19	16	19	84,2	100
Bacteria	Proteobacteria	SK259	9	9	9	100	100
Bacteria	Proteobacteria	SPOTSOC00m83	47	44	45	93,6	95,7
Bacteria	Proteobacteria	TA18	206	128	198	62,1	96,1
Bacteria	Proteobacteria	pltb-vmat-80	4	4	4	100	100
Bacteria	Spirochaetes	Spirochaetes	4615	3990	4207	86,5	91,2
Bacteria	Synergistetes	Synergistia	1672	1595	1654	95,4	98,9
Bacteria	Tenericutes	Mollicutes	3675	903	3361	24,6	91,5
Bacteria	Thermodesulfobacteri	Thermodesulfobacteria	106	99	104	93,4	98,1
Bacteria	Thermotogae	Thermotogae	736	625	712	84,9	96,7
Bacteria	Verrucomicrobia	Opitutae	521	472	513	90,6	98,5
Bacteria	Verrucomicrobia	Spartobacteria	753	30	717	4	95,2
Bacteria	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	2312	42	2108	1,8	91,2
Eukaryota		Choanoflagellida	1	0	0	0	0
Eukaryota	Alveolata	Apicomplexa	2037	0	140	0	6,9
Eukaryota	Alveolata	Chromerida	3	0	0	0	0
Eukaryota	Alveolata	Ciliophora	1666	0	1	0	0,1
Eukaryota	Alveolata	Dinophyceae	1772	0	3	0	0,2
Eukaryota	Alveolata	Ellobiopsidae	6	0	4	0	66,7
Eukaryota	Alveolata	Perkinsea	27	0	0	0	0
Eukaryota	Alveolata	Voromonas	1	0	0	0	0
Eukaryota	Amoebozoa	Archamoebae	1	0	0	0	0
Eukaryota	Amoebozoa	Centramoebida	324	0	0	0	0
Eukaryota	Amoebozoa	Flabellinea	47	0	24	0	51,1
Eukaryota	Amoebozoa	Mycetozoa	225	0	3	0	1,3
Eukaryota	Amoebozoa	Phalansterium	1	0	0	0	0
Eukaryota	Amoebozoa	Tubulinea	69	0	0	0	0
Eukaryota	Apusozoa	Ancyromonadidae	18	0	0	0	0
Eukaryota	Apusozoa	Apusomonadidae	18	0	0	0	0
Eukaryota	Breviata		1	0	0	0	0
Eukaryota	Carpediemonas		4	0	0	0	0
Eukaryota	Centroheliozoa	Acanthocystidae	18	0	0	0	0
Eukaryota	Centroheliozoa	Heterophryidae	4	0	0	0	0
Eukaryota	Choanoflagellida	Acanthoecidae	11	0	0	0	0
Eukaryota	Choanoflagellida	Codonosigidae	15	0	0	0	0
Eukaryota	Choanoflagellida	Salpingoecidae	16	0	0	0	0
Eukaryota	Corallochytrium		1	0	0	0	0
Eukaryota	Cryptophyta	Cryptomonadales	127	0	0	0	0
Eukaryota	Cryptophyta	Pyrenomonadales	102	0	0	0	0
Eukaryota	Dimorpha		1	0	0	0	0
Eukaryota	Diplomonadida	Enteromonadidae	2	0	0	0	0
Eukaryota	Diplomonadida	Hexamitidae	35	0	0	0	0
Eukaryota	Dysnectes		2	0	0	0	0
Eukaryota	Eccrinales	Eccrinaceae	10	0	0	0	0
Eukaryota	Eccrinales	Palavasciaceae	1	0	0	0	0
Eukaryota	Ergobibamus		1	0	0	0	0
Eukaryota	Euglenozoa	Diplonemida	61	0	0	0	0
Eukaryota	Euglenozoa	Euglenida	341	0	14	0	4,1
Eukaryota	Euglenozoa	Kinetoplastida	595	0	0	0	0
Eukaryota	Fungi		86	0	0	0	0
Eukaryota	Fungi	Blastocladiomycota	27	0	0	0	0
Eukaryota	Fungi	Chytridiomycota	474	0	2	0	0,4
Eukaryota	Fungi	Dikarya	9030	0	15	0	0,2
Eukaryota	Fungi	Glomeromycota	679	0	1	0	0,1
Eukaryota	Fungi	Microsporidia	75	0	0	0	0
Eukaryota	Fungi	Neocallimastigomycota	17	0	0	0	0
Eukaryota	Fungi	cryptomycota	2	0	0	0	0
Eukaryota	Glaucocystophyceae	Cyanophoraceae	2	0	0	0	0
Eukaryota	Glaucocystophyceae	Cyanoptychae	1	0	0	0	0
Eukaryota	Glaucocystophyceae	Glaucocystales	1	0	0	0	0
Eukaryota	Glaucocystophyceae	Gloeochaetales	1	0	0	0	0
Eukaryota	Haptophyceae	Coccolithales	32	0	0	0	0
Eukaryota	Haptophyceae	Coccosphaerales	8	0	0	0	0
Eukaryota	Haptophyceae	Isochrysidales	39	0	0	0	0

Eukaryota	Haptophyceae	Pavloales	54	0	0	0	0
Eukaryota	Haptophyceae	Phaeocystales	33	0	0	0	0
Eukaryota	Haptophyceae	Prymnesiales	83	0	0	0	0
Eukaryota	Haptophyceae	Reticulosphaerales	1	0	0	0	0
Eukaryota	Haptophyceae	Syracosphaerales	3	0	0	0	0
Eukaryota	Haptophyceae	Zygodiscales	6	0	0	0	0
Eukaryota	Heterolobosea		2	0	0	0	0
Eukaryota	Heterolobosea	Acrasida	1	0	0	0	0
Eukaryota	Heterolobosea	Learamoeba	1	0	0	0	0
Eukaryota	Heterolobosea	Monopylocystis	1	0	0	0	0
Eukaryota	Heterolobosea	Schizopyrenida	66	0	0	0	0
Eukaryota	Heterolobosea	Singhamoeba	2	0	0	0	0
Eukaryota	Heterolobosea	Stephanopogon	1	0	0	0	0
Eukaryota	Heterolobosea	Tulamoeba	1	0	0	0	0
Eukaryota	Hicanonectes		1	0	0	0	0
Eukaryota	Ichthyosporea	Capsaspora	9	0	0	0	0
Eukaryota	Ichthyosporea	Dermocystida	24	0	0	0	0
Eukaryota	Ichthyosporea	Ichthyophonida	58	0	0	0	0
Eukaryota	Jakobida	Andalucia	4	0	0	0	0
Eukaryota	Jakobida	Jakobidae	2	0	0	0	0
Eukaryota	Katablepharidophyta	Katablepharidaceae	14	0	0	0	0
Eukaryota	Katablepharidophyta	Roombia	1	0	0	0	0
Eukaryota	Kipferlia		11	0	0	0	0
Eukaryota	Malawimonadidae	Malawimonas	2	0	0	0	0
Eukaryota	Metazoa	Acanthocephala	51	0	46	0	90,2
Eukaryota	Metazoa	Annelida	1400	0	0	0	0
Eukaryota	Metazoa	Arthropoda	10189	0	56	0	0,5
Eukaryota	Metazoa	Brachiopoda	79	0	0	0	0
Eukaryota	Metazoa	Bryozoa	97	0	0	0	0
Eukaryota	Metazoa	Chaetognatha	22	0	1	0	4,5
Eukaryota	Metazoa	Chordata	1063	0	0	0	0
Eukaryota	Metazoa	Cnidaria	1462	0	14	0	1
Eukaryota	Metazoa	Ctenophora	34	0	0	0	0
Eukaryota	Metazoa	Cycliophora	19	0	0	0	0
Eukaryota	Metazoa	Echinodermata	228	0	1	0	0,4
Eukaryota	Metazoa	Echiura	6	0	0	0	0
Eukaryota	Metazoa	Entoprocta	18	0	0	0	0
Eukaryota	Metazoa	Gastrotricha	29	0	1	0	3,4
Eukaryota	Metazoa	Hemichordata	26	0	0	0	0
Eukaryota	Metazoa	Kinorhyncha	9	0	0	0	0
Eukaryota	Metazoa	Loricifera	1	0	0	0	0
Eukaryota	Metazoa	Mesozoa	6	0	0	0	0
Eukaryota	Metazoa	Micrognathozoa	2	0	0	0	0
Eukaryota	Metazoa	Mollusca	1489	0	2	0	0,1
Eukaryota	Metazoa	Myzostomida	45	0	0	0	0
Eukaryota	Metazoa	Nematoda	2146	0	3	0	0,1
Eukaryota	Metazoa	Nematomorpha	19	0	0	0	0
Eukaryota	Metazoa	Nemertea	102	0	0	0	0
Eukaryota	Metazoa	Onychophora	14	0	0	0	0
Eukaryota	Metazoa	Placozoa	12	0	0	0	0
Eukaryota	Metazoa	Platyhelminthes	1422	0	9	0	0,6
Eukaryota	Metazoa	Porifera	300	0	1	0	0,3
Eukaryota	Metazoa	Priapulida	23	0	0	0	0
Eukaryota	Metazoa	Rotifera	120	0	0	0	0
Eukaryota	Metazoa	Sipuncula	72	0	0	0	0
Eukaryota	Metazoa	Tardigrada	214	0	0	0	0
Eukaryota	Metazoa	Xenoturbellida	2	0	0	0	0
Eukaryota	Metromonas		1	0	0	0	0
Eukaryota	Micronuclearia		1	0	0	0	0
Eukaryota	Ministeria		2	0	0	0	0
Eukaryota	Parabasalia		48	0	0	0	0
Eukaryota	Parabasalia	Cristamonadida	61	0	0	0	0
Eukaryota	Parabasalia	Honigbergiellida	9	0	0	0	0
Eukaryota	Parabasalia	Hypotrichomonadida	4	0	0	0	0
Eukaryota	Parabasalia	Spirotrichonymphida	2	0	0	0	0
Eukaryota	Parabasalia	Trichomonadida	106	0	0	0	0
Eukaryota	Parabasalia	Trichonymphida	84	0	0	0	0
Eukaryota	Parabasalia	Tritrichomonadida	42	0	0	0	0
Eukaryota	Proleptomonas		3	0	0	0	0
Eukaryota	Reticulamoebe		3	0	0	0	0

Eukaryota	Rhizaria	Acantharea	27	0	26	0	96,3
Eukaryota	Rhizaria	Cercozoa	817	0	6	0	0,7
Eukaryota	Rhizaria	Foraminifera	103	0	0	0	0
Eukaryota	Rhizaria	Gromiidae	3	0	0	0	0
Eukaryota	Rhizaria	Haplosporidia	35	0	2	0	5,7
Eukaryota	Rhizaria	Polycystinea	70	0	9	0	12,9
Eukaryota	Rhizaria	Sticholonche	2	0	2	0	100
Eukaryota	Rhodophyta	Bangiophyceae	388	0	1	0	0,3
Eukaryota	Rhodophyta	Compsopogonophyceae	23	0	0	0	0
Eukaryota	Rhodophyta	Florideophyceae	1104	0	124	0	11,2
Eukaryota	Rhodophyta	Rhodellophyceae	18	0	1	0	5,6
Eukaryota	Rhodophyta	Stylonematophyceae	13	0	0	0	0
Eukaryota	Telonemida	Telonema	11	0	9	0	81,8
Eukaryota	Trimastix		3	0	0	0	0
Eukaryota	Viridiplantae	Chlorophyta	2477	0	2	0	0,1
Eukaryota	Viridiplantae	Streptophyta	5119	0	6	0	0,1
Eukaryota	stramenopiles		24	0	0	0	0
Eukaryota	stramenopiles	Bacillariophyta	1302	0	0	0	0
Eukaryota	stramenopiles	Bicosoecida	60	0	0	0	0
Eukaryota	stramenopiles	Blastocystis	159	0	0	0	0
Eukaryota	stramenopiles	Bolidophyceae	10	0	0	0	0
Eukaryota	stramenopiles	Chrysomerophyceae	2	0	0	0	0
Eukaryota	stramenopiles	Chrysophyceae	295	0	0	0	0
Eukaryota	stramenopiles	Devolpayella	1	0	0	0	0
Eukaryota	stramenopiles	Dictyochophyceae	31	0	0	0	0
Eukaryota	stramenopiles	Eustigmatophyceae	90	0	0	0	0
Eukaryota	stramenopiles	Hyphochytriomycetes	3	0	0	0	0
Eukaryota	stramenopiles	Labyrinthulida	329	0	0	0	0
Eukaryota	stramenopiles	Oikomonadaceae	3	0	0	0	0
Eukaryota	stramenopiles	Olisthodiscus	1	0	0	0	0
Eukaryota	stramenopiles	Oomycetes	242	0	0	0	0
Eukaryota	stramenopiles	Pelagophyceae	28	0	0	0	0
Eukaryota	stramenopiles	Phaeothamniophyceae	9	0	0	0	0
Eukaryota	stramenopiles	Pinguiphyceae	9	0	0	0	0
Eukaryota	stramenopiles	Pirsonia	7	0	0	0	0
Eukaryota	stramenopiles	Placididea	2	0	0	0	0
Eukaryota	stramenopiles	Pseudopirsonia	1	0	0	0	0
Eukaryota	stramenopiles	Raphidophyceae	53	0	0	0	0
Eukaryota	stramenopiles	Schizocladia	1	0	0	0	0
Eukaryota	stramenopiles	Slopalinida	6	0	0	0	0
Eukaryota	stramenopiles	Solenicola	3	0	0	0	0
Eukaryota	stramenopiles	Synchromophyceae	1	0	0	0	0
Eukaryota	stramenopiles	Synurophyceae	214	0	0	0	0

L'étude de la reproductibilité du bioindicateur « biomasse moléculaire microbienne » a permis d'identifier les étapes clés du mode opératoire permettant de minimiser la variabilité méthodologique de l'indicateur. Elle a également permis de mettre au point des stratégies d'analyse que ce soit au laboratoire (choix des manipulateurs et organisation des procédures techniques) mais aussi au terrain (stratégie d'échantillonnage). Ainsi, il est apparu plus judicieux de faire travailler un seul manipulateur sur plusieurs jours pour un même échantillonnage plutôt que plusieurs expérimentateurs le même jour. Dans une optique de diagnostic, les résultats ont montré qu'un nombre de trois répétitions peut être suffisant pour obtenir des valeurs moyennes représentatives de la parcelle. En revanche, le nombre d'échantillons doit être supérieur si l'objectif est de capter l'hétérogénéité spatiale de la parcelle. Cet indicateur est apparu sensible aux variations de mode d'usage des sols puisque les biomasses moléculaires microbiennes différaient entre les sols de forêt, de culture ou encore de prairie.

Ce premier bioindicateur global de la qualité microbienne des sols présente donc une bonne répétabilité au sein d'un même laboratoire. Toutefois, il serait intéressant d'envisager d'étudier la variabilité de la biomasse moléculaire microbienne dans d'autres laboratoires, avec d'autres expérimentateurs formés en vue d'une utilisation en routine de cet outil de diagnostic, et peut-être envisager sa normalisation pour que sa standardisation soit reconnue au sein de la communauté scientifique internationale.

L'étude de la répétabilité du second bioindicateur « diversité taxonomique » des communautés bactériennes et de champignons a été effectuée à partir de trois procédures d'extraction et a consisté à mesurer la variabilité de ce bioindicateur de l'étape d'extraction d'ADN jusqu'à l'analyse bioinformatique des données brutes obtenues après séquençage massif. Cette étude a permis de montrer l'importance de l'utilisation d'une seule procédure d'extraction d'ADN du sol standardisée et représentative de la grande diversité bactérien et de champignons. Dans un contexte d'écologie microbienne moderne où des études de métagénomique sont maintenant effectuées à très grande échelle spatiale, une telle démonstration permet de mieux choisir la séquence technique adaptée à ces objectifs sans rajouter de la variabilité technique. Enfin cette étude a permis de montrer que le bioindicateur diversité microbienne est sensible aux variations de mode d'usage des sols puisque les communautés microbiennes indigènes des sols de forêt étaient différentes de celles des indigènes des sols de culture ou de prairie.

Afin d'être utilisé en routine en tant qu'outil de diagnostic, un bioindicateur doit présenter une bonne robustesse technique mais aussi être sensible aux perturbations d'origines naturelles ou anthropiques des sols. La robustesse de ces deux bioindicateurs a donc été déterminée au laboratoire et leur sensibilité mesurée en fonction de différents modes d'usage du sol. Toutefois leur sensibilité nécessite d'être également mesurée dans des contextes agronomiques plus particuliers tels que des changements de pratiques agricoles dans un contexte agroécologique de développement de système de culture innovant mais aussi de réhabilitation de sols pollués.

Dans ce contexte, la suite de mes travaux de thèse a consisté à démontrer la sensibilité de ces deux bioindicateurs à certaines pratiques d'usages des sols comme le changement de système de production (culture annuelle vs culture pérenne Chapitre III) et l'évaluation de changements de travail du sol et de la gestion des résidus de culture.

Chapitre III :
**Suivi par des bioindicateurs microbiens
de la réhabilitation d'un sol pollué**

La sensibilité des deux bioindicateurs nécessite d'être mesurée en réponse à des perturbations du sol d'origines anthropiques particulières comme la gestion de sols pollués par l'épandage d'eaux usées non traitées. En effet en France, 6% des terres agricoles ont été irriguées avec des eaux usées entre les années 2000 et 2010 dans le but d'augmenter la fourniture en eau mais aussi en composés organiques et d'améliorer la croissance des plantes et la production agricole (<http://www.agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/primeur292.pdf>). Cependant, cela a conduit à une contamination aiguë et diffuse des sols car ces eaux usées peuvent contenir des composés organiques récalcitrants ainsi que des éléments traces métalliques (ETM) et des antibiotiques s'accumulant dans les sols (Lamy et al., 2006). Des concentrations importantes en ETM sont connues pour avoir des effets néfastes sur l'abondance, la diversité et l'activité des organismes du sol (Nahmani & Lavelle 2002; Kandeler et al., 1996; Ranjard et al., 2006; de Santiago-Martín et al., 2013). De plus, ils restent stockés dans les sols à long terme, rendant les sols impropres à la production alimentaire sur plusieurs générations en raison des dangers de la qualité des aliments pour la consommation humaine (Papa et al., 2010).

Dans ce contexte, il devient nécessaire de réutiliser ces sols pollués à des fins agricoles. Il faut donc développer des pratiques innovantes et être capable de suivre l'évolution de la réhabilitation biologique du sol. Dans notre cas d'étude les pratiques innovantes ont consisté à planter des cultures pérennes à vocation énergétique plutôt qu'alimentaire sur ces sols pollués, comme le *Miscanthus x giganteus*, (Evangelou et al., 2012; Ollivier et al., 2012; Pavel et al., 2014). En effet le potentiel économique de cette plante est connu (Price et al., 2004; Straub et al., 2013). De plus sa culture conduit à la formation de nouveaux habitats à travers le développement d'une couche de litière à la surface du sol et par le développement d'un système racinaire étendu et pérenne (Dauber et al., 2010; Pidlisnyuk et al., 2014; Immerzeel et al., 2014). Cette culture semble donc prometteuse pour régénérer les propriétés biologiques d'un sol altéré par une pollution dans son patrimoine biologique et ses capacités de production agricole durable.

Dans ce contexte, ce chapitre propose d'évaluer :

1) l'impact, à l'échelle de la parcelle, de la plantation de *Miscanthus x giganteus* sur l'abondance et la diversité des communautés microbiennes d'un sol pollué par un siècle d'épandage d'eaux usées (Partie A)

2) l'impact plus spécifique de ces systèmes sur la diversité taxonomique des communautés de bactéries et de champignons (Partie B)

Cette étude a fait partie du projet RESACOR coordonné par Isabelle Lamy de l'INRA de Versailles (UMR EcoSys). Le site d'étude se trouve à Pierrelaye-Bessancourt en région parisienne. Cette étude a été effectuée en deux étapes : une première étude synchronique comparant les communautés microbiennes d'un sol sous culture annuelle comparée aux communautés sous culture pérenne après quatre ans d'implantation du miscanthus ; et une étude diachronique consistant à suivre les communautés microbiennes d'un sol pendant les 3 premières années de l'implantation de la culture pérenne.

Ce chapitre est présenté sous la forme de deux articles scientifiques publiés dans la revue *Environmental Chemistry Letters*.

Partie A :

Abondance et diversité des communautés de
bactéries et de champignons



Positive effect of the *Miscanthus* bioenergy crop on microbial diversity in wastewater-contaminated soil

Emilie Bourgeois¹ · Samuel Dequiedt² · Mélanie Lelièvre² · Folkert van Oort³ · Isabelle Lamy³ · Pierre-Alain Maron¹ · Lionel Ranjard¹

Received: 26 August 2015 / Accepted: 28 August 2015
© Springer International Publishing Switzerland 2015

Abstract In France, about 90,000 ha per year of arable land become unsuitable for food production due to erosion, acidification, sealing and pollution by metallic and organic compounds. Bioenergy crops such as *Miscanthus x giganteus* are used to rehabilitate polluted soils for crop production. Although the economic potential of this crop is known, the crop abilities to regenerate the soil biological properties enabling sustainable crop production still remain unclear. Here, we evaluated the effects of the *Miscanthus* crop on the abundance and diversity of soil bacterial and fungal communities in a wastewater-contaminated soil, using synchronic and diachronic evaluation strategies. A 3-year field experiment, near Paris, was set up on an agricultural field irrigated with raw wastewater for more than 100 years, thus inducing a strong metal and organic contamination of the soil. We characterized the abundance and diversity of soil microbial communities using metagenomic techniques. Our results show that the *Miscanthus* crop had an early effect on microbial communities by stimulating bacterial diversity, by about 20 %, and fungal diversity, by about 10 %. This positive effect could be explained by the release of fresh organic matter from litter decomposition and root exudation, and by the absence of tillage and pesticide spraying, which are known to degrade soil microflora. On the other hand, no significant effect on microbial biomass has been

recorded. Overall our findings show that *Miscanthus* cropping is a promising practice to enhance the regeneration of soil microbiological diversity and to reclaim polluted soils.

Keywords Soil pollution · Microbial diversity · *Miscanthus x giganteus* · Remediation · Trace metals

Introduction

To date, most of the agricultural soils in France were used under intensive farming requiring consistent soil tillage and chemical fertilizers and pesticides inputs. Soil amendments with manure, sewage sludge or irrigation with urban wastewater, were also common practices. Between 2000 and 2010, 6 % of the agricultural land surface (about 1.4 million hectares) was irrigated with wastewater, providing readily degradable organic compounds, which are useful to improve plant growth and crop production (<http://www.agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/primeur292.pdf>). However, such practices often result in acute and diffuse contaminations of the soil since wastewater may contain important amount of recalcitrant organic compounds, trace metals and antibiotics, leading to a high level of accumulation of toxic exogenous metallic or organic compounds in these soils (Lamy et al. 2006).

High levels of exogenous trace metals can have a detrimental effect on the number, diversity and activity of soil organisms such as soil macrofauna (Nahmani and Lavelle 2002) and microorganisms (Kandeler et al. 1996; Ranjard et al. 2006). As soil microorganisms play a crucial role in soil quality and functioning, e.g., in soil aggregate structure, organic matter turn-over and mineralization, community diversity modifications consecutive to metal stress might also affect soil biological functioning and

✉ Lionel Ranjard
ranjard@diijon.inra.fr

¹ UMR 1347 Agroécologie, INRA, 17 rue de Sully, 21065 Dijon, France

² UMR 1347 Agroécologie- plateforme GenoSol, INRA, 17 rue de Sully, 21065 Dijon, France

³ AgroParisTech UMR 1402 ECOSYS - Ecotoxicology Team, INRA, 78026 Versailles Cedex, France

affect some of the ecosystem services provided by soil (Bååth et al. 1998). Trace metals, in addition to their negative effects on soil organisms, have a long residence time in soils, which become unsuitable for crop production over several generations due to the decrease in soil fertility and/or hazards of food quality for human consumption.

Recently, a strategy has been developed to rehabilitate agricultural activity on polluted soils: the use of plants not dedicated to food consumption for humans or animals but intended for bioenergy production (Evangelou et al. 2012). Plant cover prevents bulk erosion and increases soil carbon sequestration, which can further limit the toxicity and vertical transfer of metals by improving stabilization of the metals in soils. Among the various energy crops, the C4 grass *Miscanthus x giganteus* (named Giant Miscanthus) has been recommended as a suitable biofuel crop, and its cultivation is now widespread in Europe. It is a perennial crop displaying an efficient use of nitrogen and water, good disease resistance and high economic potential. In addition, it shows good growth quality on contaminated sites (Lewandowski et al. 2003). Several field trials have demonstrated that planting Giant Miscanthus modifies soil disturbance (absence of tillage, reduced use of pesticides) and leads to the formation of new habitats, through the development of surface litter and extensive root systems, with impacts on pollutant dynamics as well as on organisms living in soil (Dauber et al. 2010). Several studies conducted on soil fauna revealed an increase in soil mesofauna and macrofauna abundance and diversity, when MxG bioenergy crops, rather than annual wheat crops, were grown on polluted soils (Chauvat et al. 2014; Hedde et al. 2013). By contrast, the effect on microorganisms of planting Giant Miscanthus in polluted soils has been poorly investigated and it is not known if this practice has a positive or negative impact on bacterial and fungal communities. Such information is essential with respect to major role of microorganisms in processes underlying soil fertility and sustainable crop production.

The aim of this study was to elucidate the effects of *Miscanthus x giganteus* cropping on the indigenous microbial communities in a long-term contaminated soil. Investigations were carried out on a real-field location close to Paris (Pierrelaye, France), which had been irrigated with raw wastewater for more than a 100 years. These inputs led to the accumulation of a huge amount of recalcitrant organic matter, especially in the soil surface horizon, as well as micro-pollutants, especially Zn, Pb, Cu, and Cd trace metals (van Oort et al. 2008). The short-term impact of Miscanthus crop on microbial communities was assessed by (1) a synchronic comparative study of plots planted with Giant Miscanthus for 4 years and a plot under a conventional wheat crop system and by (2) a diachronic study monitoring microbial community dynamics during

3-year period following the planting of Giant Miscanthus. Microbial communities were characterized in terms of molecular microbial biomass (Dequiedt et al. 2011) as well as bacterial and fungal diversity (454 pyrosequencing of the 16S and 18S rRNA genes directly amplified from soil DNA). We hypothesized that Miscanthus crop, in comparison with conventional cropping, would stimulate more microbial abundance and diversity in this polluted soil by providing new soil habitats for microorganisms, thus limiting the influence of metal contamination and the prevalence of resistant populations and therefore enhancing soil biological quality and fertility.

Materials and methods

Experimental site history and soil sampling design

Studies were conducted on a field site close to Paris within a ~1200 ha-wide agricultural area at Pierrelaye (France, latitude, 49°01'N; longitude, 2°10'E). The soils at this site are sandy textured, classified as Orthic and Albic Luvisols (IUSS Working Group WRB, 2006). For more than a century, they have been used for market gardening and irrigated with raw wastewater from the urban Paris in order to increase the organic quality of this soil by supplying C, N, and K inputs. However, they also led to the accumulation of recalcitrant organic matter, dissolved salts (carbonates, phosphates) and metallic pollutants in the surface horizon of the soil (Lamy et al. 2006; van Oort et al. 2008). As a consequence, the spreading of raw wastewater was finally stopped in the early 2000s and the market gardening was prohibited to promote cereal cropping and to introduce bioenergy crops, especially the C4 grass *Miscanthus x giganteus*. The experimental site in this agricultural area was composed of three plots (Fig. 1). The first, P1 (670 m²), was implanted with Giant Miscanthus (English cultivar from Novabiom[®], France) in 2007. The second, P6 (450 m²), was under an annual crop system (tillage and crop rotations of wheat/sorghum/triticale and maize in 2010), and the third P8 plot (1700 m²) was planted with Giant Miscanthus in 2009 (English cultivar from Novabiom[®], France).

The impact of *Miscanthus x giganteus* perennial cropping on microbial communities was assessed by (a) a synchronic comparative analysis of the microbial communities in the P1 and P6 plots in 2011, and (b) a diachronic study in P8 by monitoring the microbial communities during a 3-year period of Giant Miscanthus growth following its planting in 2009. All samples were taken at a depth of 0–20 cm. Five replicates were collected from P1 and P6, in March 2011 for the synchronic study, and from P8 in March 2009, 2010 and 2011 for the diachronic study.

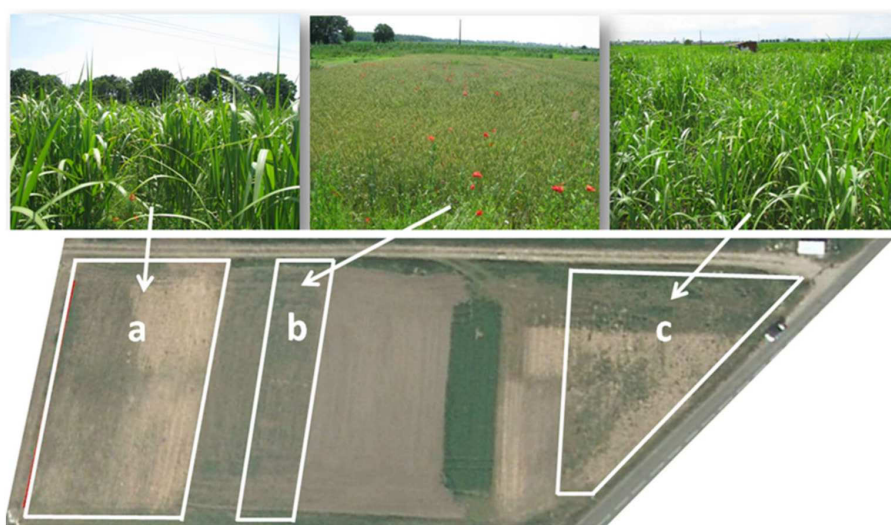


Fig. 1 Design of the experimental site of Pierrelaye used in this study. The site was divided in three plots: **a** P8 plot planted in 2009 with *Miscanthus x giganteus*, **b** P6 plot under cereal crop system and, **c** P1 plot planted in 2007 with *Miscanthus x giganteus*

The soils were sieved (4 mm), lyophilized at -80°C and stored at -40°C . Major physic and geochemical characteristics (pH, texture, trace elements) were determined by the Soil Analysis Laboratory at INRA (Arras, France), according to standard international procedures (Table 1).

Molecular microbial biomass

Microbial DNA was extracted from 1 g of each soil sample after careful quartering, using a single procedure standardized by the GenoSol platform (INRA Dijon, France; Terrat et al. 2012). DNA concentrations of crude extracts were determined by electrophoresis in 1 % agarose gel according to a calf thymus DNA standard curve, and used as estimates of microbial molecular biomass (Dequiedt et al. 2011). After quantification, DNA samples were purified according to Terrat et al. (2012).

Bacterial and fungal diversity

Bacterial diversity was estimated by 454 pyrosequencing of the 16S rRNA V3-V4 gene region as described by Terrat et al. (2012). The gene fragment (about 400 bp) was first amplified by using the primers F479 and R888. Then a second PCR was run on purified PCR products from the first PCR, using ten based-pair multiplex identifiers (MID) added to the primers at 5' position to specifically identify each sample. Similarly, fungal diversity was estimated by 454 pyrosequencing of the 18S rRNA. A gene fragment of about 350 bp was first amplified using the primers FR1 and FF390. Then, a second PCR was run on purified PCR products from the first PCR, using ten based-pair multiplex

identifiers (MID) added to the primers at 5' position. The PCR products were finally purified and pyrosequencing was then carried out on a GS Junior (Roche 454 Sequencing System).

Bioinformatics analysis

A bioinformatics analysis was done using the GnS-Pipe of the GenoSol platform as described by Terrat et al. (2012). First, all the 16S and 18S raw reads were sorted according to the multiplex identifier sequences. The raw reads were then filtered and deleted based on: (a) their length, (b) their number of ambiguities (Ns), (c) and their primer(s) sequence(s). A PERL program was then applied for rigorous dereplication (i.e., clustering of strictly identical sequences). The dereplicated reads were then aligned using Infernal alignment, and clustered into operational taxonomic units (OTU) using a PERL program that groups rare reads to abundant ones, and does not count differences in homopolymer lengths. A filtering step was then carried out to check all single-singletons (reads detected only once and not clustered, which might be artifacts, such as PCR chimeras) based on the quality of their taxonomic assignments. Finally, in order to compare the datasets efficiently and avoid biased community comparisons, the retained reads were homogenized by random selection closed to the lowest dataset.

The retained high-quality reads (3044 for bacteria and 6467 for fungi) were used for taxonomy-independent analyses, to determine diversity and richness indices using the defined OTU composition at 95 % similarity. The raw data sets are available on the EBI database system under

project accession number PRJEB9069. We used the maximum number of OTUs and Evenness indexes as indicators of soil microbial richness and structure, respectively.

Statistical analyses

For the synchronic study, molecular microbial biomass and microbial diversity indices (richness and evenness) were compared by Student's *t* test ($P < 0.05$) using XLSTAT software (Addinsoft®). For the diachronic study, differences between molecular microbial biomass, and the microbial diversity indices for P8 soils for the years 2009, 2010 and 2011 were compared by analysis of variance (ANOVA, multiple paired comparisons) and the differences between them by Fisher's test ($P < 0.05$) using XLSTAT software (Addinsoft®). Significance was assessed at the $P < 0.05$ level.

Results and discussion

On the Pierrelaye site, irrigation with wastewater was initially intended to increase the fertility of the sandy-textured soils used for market gardening but also led to an homogeneous and important accumulation of recalcitrant organic matter (high C:N ratio between 23 and 30) and metal elements which was previously described by Lamy et al. (2006) (Table 1). In this context we have conducted synchronic and diachronic studies to evaluate the effect of Miscanthus crop on soil microbiological community in terms of abundance, diversity and structure for a subsequent agricultural restoration.

Influence of wastewater irrigation on agronomical and microbiological soil characteristics

In all plots of the studied site, it is important to note that the level of microbial biomass (from $37 \mu\text{g DNA g}^{-1}$ soil to $44 \mu\text{g DNA g}^{-1}$ soil) and diversity (from 923 to 1150 bacterial taxons and from 640 to 807 fungal ones) was high (Figs. 2, 3) and did not reflect neither the sandy texture of the soil (Dequiedt et al. 2011; Terrat et al. 2012) nor the impact of the metal pollution acknowledged to decrease these microbial parameters (Kuperman and Carreiro 1997). These results might be explained by the large amount of soil organic carbon accumulated by irrigation with raw wastewater for one century that limits metal toxicity (Iqbal et al. 2013) and stimulates microbial abundance and diversity (Hidri et al. 2010). However, the high C:N ratio recorded for the soil organic matter in these soils (from 23 to 30) does not fit these findings since it indicates a strong stabilization of the soil organic matter. The large C:N ratio may point to an unusual, urban nature of the organic matter

Table 1 Physico-chemical characteristics and concentration of trace metal elements in studied soils (0–20 cm)

Year	Clay g/kg	Silt	Sand	Org. C	Tot. N	C/N	pH	CaCO ₃ g/kg	Fe mg/kg	Zn mg/kg	Pb	Cu	Cd	
P1	2011	80 ± 7	112 ± 3	808 ± 6	68.9 ± 14.8	2.5 ± 0.2	27.0 ± 3.4	7.6 ± 0.1	42.3 ± 6.3	15.2 ± 1.3	581 ± 52	389 ± 113	184 ± 36	2.55 ± 0.32
P6				62.0 ± 11.3	2.0 ± 0.2	30.0 ± 406	7.6 ± 0.0	28.1 ± 7.7	15.9 ± 1.6	593 ± 79	344 ± 83	182 ± 24	2.73 ± 0.41	
P8	2009			39.3 ± 4.9	1.7 ± 0.2	22.8 ± 0.5	7.6 ± 0.0	26.8 ± 5.4	13.0 ± 1.1	568 ± 85	326 ± 62	159 ± 20	2.65 ± 0.27	
	2011			45.4 ± 5.0	1.9 ± 0.1	23.4 ± 1.0	7.6 ± 0.0	32.0 ± 5.0	14.6 ± 0.6	574 ± 42	397 ± 137	173 ± 14	2.82 ± 0.10	

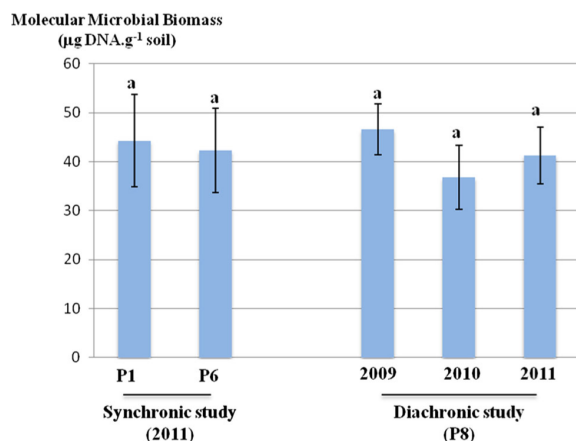


Fig. 2 Molecular microbial biomass of plots according to soil management. Letters indicate statistical significance ($P < 0.05$) with five replicates for synchronic study and three replicates for diachronic study. No significant differences were observed between the Miscanthus crop (P1) compared to annual conventional wheat crop (P6) for the synchronic study, and during the 3-year Miscanthus implantation (in P8) for the diachronic study

spread by irrigation and/or the deleterious effect of metal elements on organic matter turnover (Lamy et al. 2006).

Response of microbial community to Miscanthus crop

The short-term synchronic comparison of microbial abundance and diversity in plot soil under MxG for 4 years (P1) and plot soil under a conventional crop system with maize (P6) was conducted in 2011 (Fig. 1). No significant difference was observed for molecular microbial biomass or for bacterial diversity, in terms of richness and evenness (Figs. 2, 3). These results could reflect the impact of trace metal pollution history as being the main factor structuring the soil microbial community and homogenizing the microbial parameters between plots. In addition, the recalcitrance of organic matter with a high C:N ratio (about 28.5) would explain the poor availability of nutrient resources for bacteria leading to a low reactivity and high stability of this community to surrounding changing conditions (Rousk and Bååth 2007). On the other hand, the absence of bacterial discrimination might also be partly due to the relatively short period of MxG cultivation on this site (from 2007 to 2011), since this crop is known to require more than 5 years to become fully established.

As regards fungal 18S rRNA gene sequencing, fungal diversity was significantly higher under the Miscanthus crop due to an increase in richness (about 807 taxa for P1 against 726 for P6, Fig. 3), whereas fungal evenness was similar in both cropping systems. Increases in fungal

richness can be partly due to the halting of certain agricultural practices such as tillage and some use of antifungal pesticide products in the P1 plot. Soil tillage leads to the physical breakdown of fungal mycelium and of their macroaggregates habitats resulting in deleterious effects on the abundance and diversity of soil fungi (Lienhard et al. 2014). However, our observation can also highlight the beneficial effect of Miscanthus cropping, since perennial cover plants provide a stable environment and habitats, with fresh organic matter input due to the release of root exudates and the accumulation of litter plant residue litter on the soil surface (Chauvat et al. 2014). The greater stimulation of fungi, as compared to bacteria, might result from their role in litter decomposition, their ability to produce a wide range of extracellular enzymes enabling them to use the recalcitrant organic matter such as lignocellulose or other plant polymers. This ability was particularly relevant on our site where the soil organic matter was rather recalcitrant (C/N ratio about 28.5). This synchronic study revealed, therefore, a significant higher stimulation of microbial diversity by Miscanthus cropping compared to conventional annual wheat crop.

Dynamics of soil microbial communities during the implantation of Miscanthus crop

To complement the synchronic comparison, diachronic monitoring was carried out in the P8 plot, planted with Giant Miscanthus, from 2009 to 2011 (Fig. 1). During this period, the molecular microbial abundance did not vary significantly (about 46.6 µg DNA g⁻¹ soil in 2009 compared with 41.3 µg DNA g⁻¹ soil in 2011, Fig. 2) according with the synchronic study. The bacterial richness and evenness parameters remained similar 1 year after MxG planting but showed a significant increase during the second year from 2010 to 2011 (Fig. 3, e.g., from 982 taxa in 2009 to 1158 in 2011). These results assessed an early beneficial effect of the Miscanthus crop on bacterial diversity, stimulating richness and improving evenness, possibly via the release of fresh litter and root exudates containing readily available C-substrates (Kaňová et al. 2010).

Monitoring of the fungal community during the 3 years of Miscanthus cropping revealed a significant increase in fungal diversity during the first year of Miscanthus implantation, which was resilient during the second year (Fig. 3). Similarly, the fungal evenness increased slightly (but not significantly) during this period. These results confirmed those obtained with the synchronic study and lead to the conclusion that Miscanthus crops stimulate fungal diversity.

The synchronic and diachronic evaluations of the effect of Miscanthus bioenergy cropping on the microbial

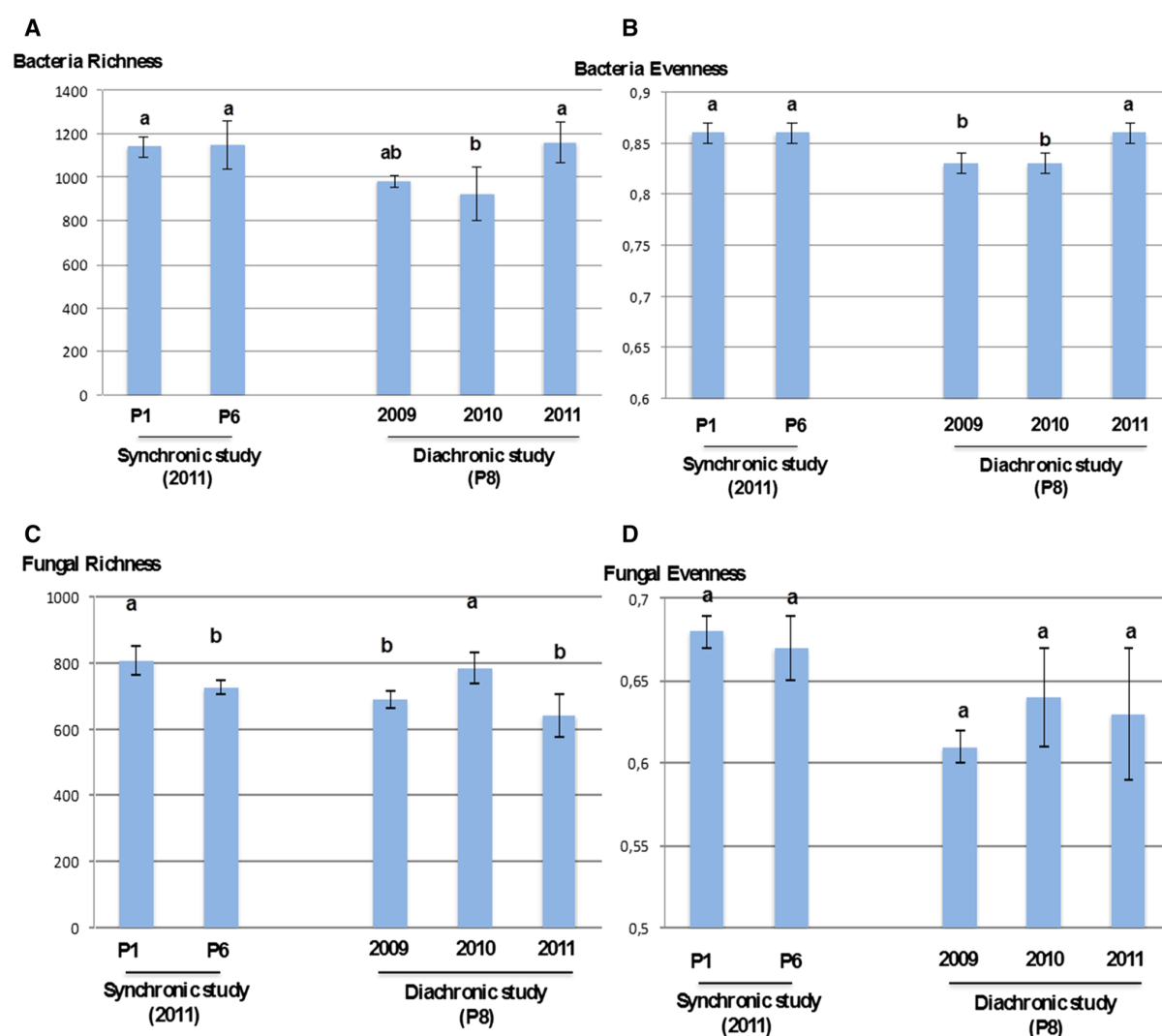


Fig. 3 Bacterial and fungal richness (a, c) and evenness (b, d) of plots according to soil management. Letters indicate statistical significance ($P < 0.05$) with five replicates for synchronic study and three replicates for diachronic study. For synchronic study, a

significant increase was only recorded for fungal richness in *Miscanthus* crop compared to annual conventional wheat crop. For diachronic study, a significant increase was only observed for bacterial richness during the 3-year *Miscanthus* implantation

community in a long-term wastewater-contaminated site did not reveal any significant modification of molecular microbial biomass but highlighted positive effects on microbial communities diversity. The absence of effect on molecular microbial biomass might be partly explained by the young stage of development of this crop (from 2 to 4 years) combined with the strong structuring of the microbial community brought about by the long history of metallic and organic pollution of the site. Giant *Miscanthus* cropping seemed to have an early effect on bacterial and fungal diversity by stimulating richness and improving evenness probably due to the release of fresh organic

matter through litter accumulation and root exudation. In conclusion, *Miscanthus* planting seemed to provide new habitats and resources leading to a restoration of soil biological patrimony and potentially functioning via an improvement of microbial diversity. Similar results were observed on this site when soil mesofauna was targeted (Chauvat et al. 2014; Hedde et al. 2013). Our results demonstrate that planting a perennial *Miscanthus* bioenergy crop on contaminated soils can be considered as a good strategy to restore soil microbial diversity with the aim to rehabilitate polluted sites for their subsequent agricultural use.

Acknowledgments This work was partly supported by an ANR-08-CESA-012 grant for the Resacor project from the French National Research Agency. The authors thank B Brouant (Chambre Interdépartementale d'Agriculture d'Ile de France) for the setup of *Miscanthus* plots, Mr Leconte (farmer) for the setup of other cropping systems and providing easy access, and J.P. Pétraud (INRA, UMR 1402) for marking and maintenance of the experimental site. This work, through the involvement of technical facilities of the GenoSol platform of the infrastructure ANAEE France, received a grant from the French state through the National Agency for Research under the program "Investments for the Future" (reference ANR-11-INBS-0001), as well as a grant from the Regional Council of Burgundy.

References

- Bååth E, Díaz-Raviña M, Frostegård A, Campbell CD (1998) Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Appl Environ Microbiol* 64:238–245
- Chauvat M, Perez G, Hedde M, Lamy I (2014) Establishment of bioenergy crops on metal contaminated soils stimulates below-ground fauna. *Biomass Bioenergy* 62:207–211. doi:10.1016/j.biombioe.2014.01.042
- Dauber J, Jones MB, Stout JC (2010) The impact of biomass crop cultivation on temperate biodiversity. *GCB Bioenergy* 2:289–309. doi:10.1111/j.1757-1707.2010.01058.x
- Dequiedt S, Saby NPA, Lelièvre M, Jolivet C, Thioulouse J, Toutain B, Arrouays D, Bispo A, Lemanceau P, Ranjard L (2011) Biogeographical patterns of soil molecular microbial biomass as influenced by soil characteristics and management. *Glob Ecol Biogeogr* 20:641–652. doi:10.1111/j.1466-8238.2010.00628.x
- Evangelou MWH, Conesa HM, Robinson BH, Schulin R (2012) Biomass production on trace element-contaminated land: a review. *Environ Eng Sci* 29:823–839. doi:10.1089/ees.2011.0428
- Hedde M, van Oort F, Renouf E, Thénard J, Lamy I (2013) Dynamics of soil fauna after plantation of perennial energy crops on polluted soils. *Appl Soil Ecol* 66:29–39. doi:10.1016/j.apsoil.2013.01.012
- Hidri Y, Bouziri L, Maron PA, Anane M, Jedidi N, Hassan A, Ranjard L (2010) Soil DNA evidence for altered microbial diversity after long-term application of municipal wastewater. *Agron Sustain Dev* 30:423–431. doi:10.1051/agro/2009038
- Iqbal M, Bermond A, Lamy I (2013) Impact of miscanthus cultivation on trace metal availability in contaminated agricultural soils: complementary insights from kinetic extraction and physical fractionation. *Chemosphere* 91:287–294. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.11.032
- Kandeler E, Kampichler C, Horak O (1996) Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biol Fertil Soils* 23:299–306. doi:10.1007/BF00335958
- Kaňova H, Carre J, Vranova V, Rejšek K, Formanek P (2010) Organic compounds in root exudates of *Miscanthus x Giganteus* greif et deu and limitation of microorganisms in its rhizosphere by nutrients. *Acta Univ Agric Silvic Mendel Brun* 58:203–208. doi:10.11118/actaun201058050203
- Kuperman RG, Carreiro MM (1997) Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem. *Soil Biol Biochem* 29:179–190. doi:10.1016/S0038-0717(96)00297-0
- Lamy I, van Oort F, Dère C, Baize D (2006) Use of major- and trace-element correlations to assess metal migration in sandy Luvisols irrigated with wastewater. *Eur J Soil Sci* 57:731–740. doi:10.1111/j.1365-2389.2005.00765.x
- Lewandowski I, Scurlock JMO, Lindvall E, Christou M (2003) The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. *Biomass Bioenergy* 25:335–361. doi:10.1016/S0961-9534(03)00030-8
- Lienhard P, Terrat S, Chemidlin Prévost-Bouré N, Nowak V, Régnier T, Sayphoummie S, Panyasiri K, Tivet F, Mathieu O, Levêque J, Maron PA, Ranjard L (2014) Pyrosequencing evidences the impact of cropping on soil bacterial and fungal diversity in Laos tropical grassland. *Agron Sustain Dev* 34:525–533. doi:10.1007/s13593-013-0162-9
- Nahmani J, Lavelle P (2002) Effects of heavy metal pollution on soil macrofauna in a grassland of Northern France. *Euro J Soil Biol* 38:297–300. doi:10.1016/S1164-5563(02)01169-X
- Ranjard L, Lignier L, Chaussod R (2006) Cumulative effects of short-term polymetal contamination on soil bacterial community structure. *Appl Environ Microbiol* 72:1684–1687. doi:10.1128/AEM.72.2.1684-1687.2006
- Rousk J, Bååth E (2007) Fungal and bacterial growth in soil with plant materials of different C/N ratios. *FEMS Microbiol Ecol* 62:258–267. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00398.x
- Terrat S, Christen R, Dequiedt S, Lelièvre M, Nowak V, Regnier T, Bachar D, Plassart P, Wincker P, Jolivet C, Bispo A, Lemanceau P, Maron PA, Mougel C, Ranjard L (2012) Molecular biomass and MetaTaxogenomic assessment of soil microbial communities as influenced by soil DNA extraction procedure. *Microb Biotechnol* 5:135–141. doi:10.1111/j.1751-7915.2011.00307.x
- van Oort F, Jongmans AG, Lamy I, Baize D, Chevallier P (2008) Impacts of long-term waste-water irrigation on the development of sandy Luvisols: consequences for metal pollutant distributions. *Eur J Soil Sci* 59:925–938. doi:10.1111/j.1365-2389.2008.01047.x

Partie B :

Composition taxonomique des communautés de
bactéries et de champignons

Miscanthus bioenergy crop stimulates nutrient-cycler bacteria and fungi in wastewater-contaminated agricultural soil

Emilie Bourgeois¹ · Samuel Dequiedt² · Mélanie Lelièvre² · Folkert van Oort^{3,4} · Isabelle Lamy^{3,4} · Lionel Ranjard¹ · Pierre Alain Maron¹

Received: 27 August 2015 / Accepted: 29 September 2015
© Springer International Publishing Switzerland 2015

Abstract Wastewater can be recycled in agricultural soil as fertilizer to increase crop yields. However, adding wastewater induces sometimes ecotoxicological issues such as pollution by toxic compounds, which may lead to the loss of arable land. Bioenergy crops such as *Miscanthus* × *giganteus* have been tested to rehabilitate polluted soils, but the impact of *Miscanthus* on soil microbes is unknown. Here, we evaluated the effects of *Miscanthus* cropping on bacterial and fungal taxonomic composition in a wastewater-contaminated soil using synchronic and diachronic evaluation strategies. A 3-year field experiment close to Paris was set up on an agricultural site irrigated by raw wastewater for more than one century, thus resulting in strong metal and organic contamination. Soil microbial taxonomic composition was characterized by direct analysis of soil DNA using metagenomic tools such as 454 pyrosequencing of ribosomal genes. Our results demonstrate that *Miscanthus* cropping stimulates specific populations of bacteria such as *Rhizobiales*, increased by 1.4 in relative abundance, *Nitrospira* (x1.5), *Azospira* (x2), and

Gemmatimonas (x2), and fungi: *Glomeromycota* (x3) and *Mortierella* (x1.5) for fungi. Noteworthy, these microbial genera are known to be strongly involved in plant symbiosis, organic matter mineralization, and nutrient cycling. Overall our findings show that *Miscanthus* cropping enhances regeneration of soil microbiological functions and services in polluted soil by stimulating populations beneficial for soil fertility and crop production.

Keywords Soil pollution · Microbial diversity · *Miscanthus* × *giganteus* · Rehabilitation · Trace metals

Introduction

In France, 29 million hectares of soil are used for agriculture, i.e., about 54 % of the surface area of the French national territory. In these soils, to limit intensive farming and the input of chemical fertilizer, alternative strategy has been developed such as the reuse of raw municipal wastewater for irrigation. To date about 6 % of the agricultural land surface was irrigated with wastewater, improving soil fertility and crop productivity (<http://www.agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/primeur292.pdf>). However, treated urban wastewater may contain humic substances, heavy metals, pesticides, products of disinfection, industrial contaminants, microorganisms, inorganic and organic compounds, and pharmaceuticals and personal care products. Therefore, such practices often result in ecotoxicological and sanitary problems due to the high level of accumulation of toxic exogenous metallic or organic compounds in these soils (Lamy et al. 2006; Tamtam et al. 2011).

As microorganisms are the most ubiquitous, diverse, and abundant living organisms in soil, and play key role in a wide range of biogeochemical cycles with agronomic

✉ Lionel Ranjard
lionel.ranjard@dijon.inra.fr
Pierre Alain Maron
pamaron@dijon.inra.fr

¹ INRA, UMR1347 Agroecology, 17 rue de Sully, 21000 Dijon, France

² INRA, UMR1347 Agroecology, Plateform GenoSol, 17 rue de Sully, 21000 Dijon, France

³ INRA, UMR 1402 ECOSYS, 78850 Thivernal-Grignon, France

⁴ AgroParisTech, UMR 1402 ECOSYS, 78850 Thivernal-Grignon, France

consequences on soil fertility, several studies have investigated the ecological impact of irrigation with wastewater on soil microbial communities. In certain cases, raw wastewater irrigation stimulated microbial abundance and diversity demonstrating a positive effect of this practice (Hidri et al. 2010). Contrastingly, other studies highlighted that the high accumulation of trace metals and organic pollutants could also lead to an alteration of microbial abundance and important shifts in community diversity and composition (Kandeler et al. 1996; Ranjard et al. 2006), with strong repercussions on soil biological functioning and ecosystem services (Bååth et al. 1998). As a consequence, soils irrigated with wastewater become unsuitable for crop production over several generations due to the decrease in soil fertility and/or hazards of food quality for human consumption.

In a context of loss of surface area of arable land in France and more widely in Europe, due to intensive agriculture leading to soil erosion, acidification and pollution, it is now crucial to develop strategy for restoring these soils by the improvement of their soil biological patrimony. In this context, phytoremediation technologies have been developed during the last decade, which consists of growing plants on polluted soil with an aim to improve stabilization of the metals in soils or plants, and thus reducing their biological toxicity and depth migration (Pavel et al. 2014). Furthermore, plant cover also prevents bulk erosion and improves soil carbon sequestration, which can further limit the toxicity and vertical transfer of metals. Recently, another strategy has been developed to rehabilitate agricultural activity on polluted soils: the use of plants for bioenergy production (Evangelou et al. 2012). One of the most used plants for bioenergy crop is the C4 grass *Miscanthus × giganteus* which is suitable for biofuel crop in Europe (Lewandowski et al. 2003). Previous studies have demonstrated that *Miscanthus* crop stimulates positively the abundance and diversity of soil collombola (Chauvat et al. 2014) as well as the resident detritivores and rhizophagous species of soil invertebrates (Hedde et al. 2013), few works have investigated its impact on soil microbial communities.

In a previous study, we have demonstrated that planting Giant *Miscanthus* on agricultural soils polluted by a long-term raw wastewater irrigation modifies microbial community by stimulating bacterial and fungal diversity in terms of richness (number of species) and evenness (Bourgeois et al. 2015). These first results revealed that the implantation of bioenergy crop on polluted soil may represent a good strategy to restore soil microbiological patrimony. It is now important to elucidate which microbial populations are shifted by *Miscanthus* implantation in order to better understand the functions and more widely the services that may be subsequently restored.

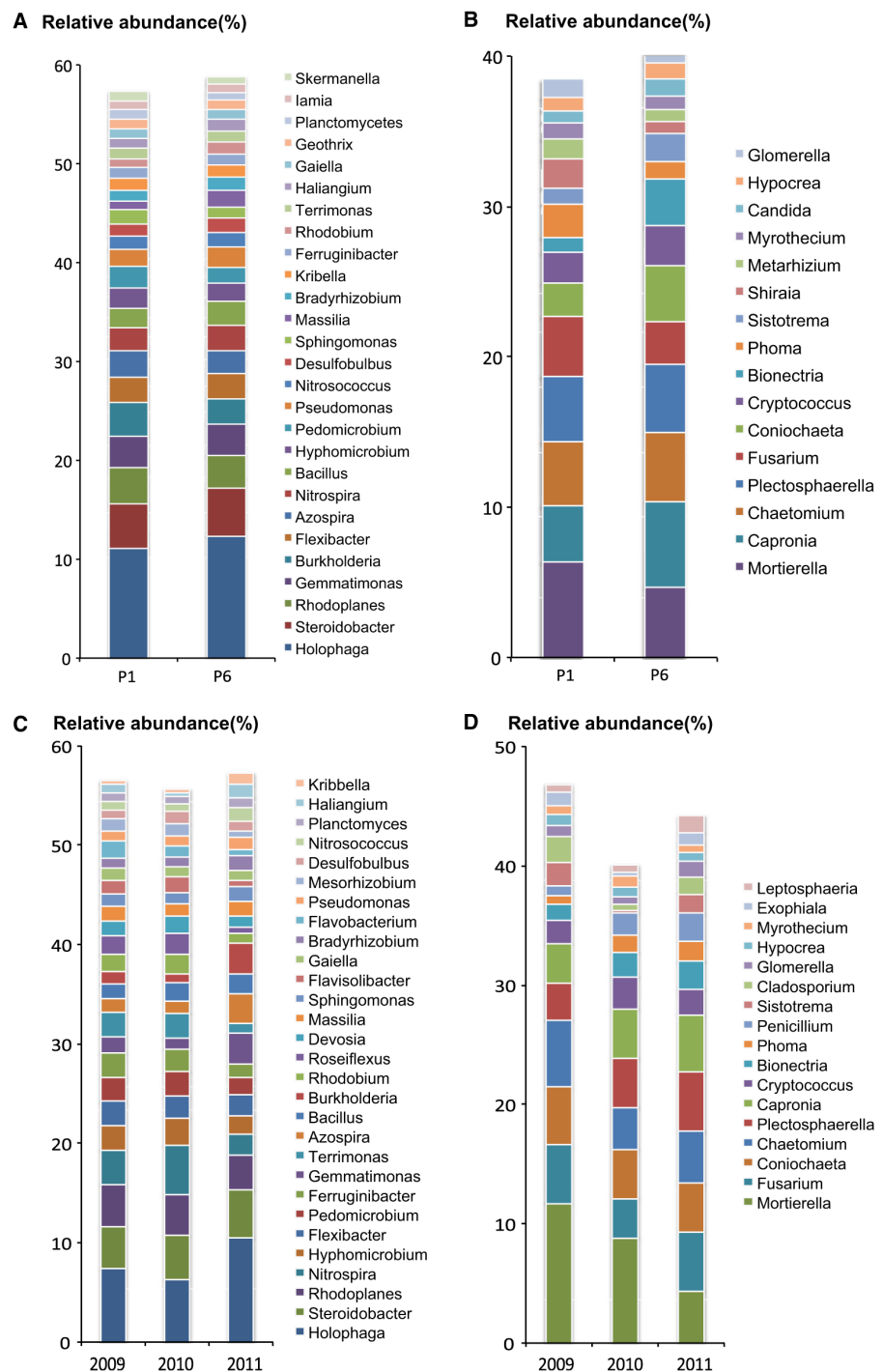
The aim of this study was to elucidate the effects of *Miscanthus × giganteus* cropping on the indigenous microbial community composition in a long-term contaminated soil. Investigations were carried out on a real-field location close to Paris (Pierrelaye, France), which had been irrigated with raw wastewater for more than 100 years. These inputs led to the accumulation of a huge amount of recalcitrant organic matter, especially in the soil surface horizon, as well as micropollutants, especially Zn, Pb, Cu, and Cd trace metals (Lamy et al. 2006; van Oort et al. 2008). The short-term impact of MxG on microbial communities was assessed by (1) a synchronic comparative study of plots planted with Giant *Miscanthus* for 4 years and a plot under a conventional wheat crop system and by (2) a diachronic study monitoring bacterial and fungal community dynamics during 3-year period following the planting of *Miscanthus*. Microbial communities were characterized in terms of bacterial and fungal composition by identifying the different dominant taxonomic groups by high-throughput sequencing (454 pyrosequencing) of ribosomal genes (16S rRNA for bacteria and 18S rRNA for fungi). We hypothesized that *Miscanthus* crops may restore the soil biological functioning through the stimulation of microbial populations involved in close direct interactions with plants (i.e., symbiosis) and in nutrient cycling, by providing new soil habitats and less recalcitrant organic matter, leading to an increase in soil fertility and plant productivity in polluted soils.

Materials and methods

Experimental site history and soil sampling design

Studies were conducted on a field site close to Paris within a ~1200-ha-wide agricultural area at Pierrelaye (France, latitude, 49°01'N; longitude, 2°10'E). The soils at this site are sandy textured, classified as Orthic and Albic Luvisols (IUSS Working Group WRB 2006). For more than a century, they have been used for market gardening and irrigated with raw wastewater from the urban Paris in order to increase the organic quality of this soil by supplying C, N, and K inputs. However, they also led to the accumulation of recalcitrant organic matter, dissolved salts (carbonates, phosphates), and metallic pollutants in the surface horizon of the soil (Lamy et al. 2006; van Oort et al. 2008). As a consequence, the spreading of raw wastewater was finally stopped in the early 2000s, and the market gardening was prohibited to promote cereal cropping and to introduce bioenergy crops, especially the C4 grass *Miscanthus × giganteus*. The experimental site in this agricultural area was composed of three plots (Bourgeois et al. 2015). The first, P1 (670 m²), was implanted with *Miscanthus* crop

Fig. 1 Relative abundance of both dominant **a** bacterial and **b** fungal genera (relative abundance >1 %) in microbial community under *Miscanthus* crop (P1) and annual wheat crop system (P6) and of both dominant **c** bacterial and **d** fungal genera (relative abundance >1 %) in P8 microbial communities for years 2009, 2010 and 2011



(English cultivar from Novabio™, France) in 2007. The second, P6 (450 m²), was under an annual crop system (tillage and crop rotations of wheat/sorghum/triticale and maize in 2010), and the third P8 plot (1700 m²) was

planted with MxG in 2009 (English cultivar from Novabio™, France).

The impact of *Miscanthus* × *giganteus* perennial cropping on microbial communities was assessed by (a) a

synchronic comparative analysis of the microbial communities in the P1 and P6 plots in 2011, and (b) a diachronic study in P8 by monitoring the microbial communities during a 3-year period of *Miscanthus* growth following its planting in 2009 (Bourgeois et al. 2015). All samples were taken at a depth of 0–20 cm. Five replicates were collected from P1 and P6, in March 2011 for the synchronic study, and from P8 in March 2009, 2010 and 2011 for the diachronic study. The soils were sieved (4 mm), lyophilized at -80°C and stored at -40°C . Major physic and geochemical characteristics (pH, texture, and trace elements) were determined by the Soil Analysis Laboratory at INRA (Arras, France), according to standard international procedures (Table 1).

Microbial taxonomic inventory

Pyrosequencing of 16S and 18S rRNA gene sequences

Microbial DNA was extracted from 1 g of each soil sample after careful quartering, using a single procedure standardized by the GenoSol platform (INRA Dijon, France; Terrat et al. 2012). Bacterial composition was estimated by 454 pyrosequencing of the 16S rRNA V3-V4 gene region as described by Terrat et al. (2012). The gene fragment (about 400 bp) was first amplified by using the primers F479 and R888. Then, a second PCR was run on purified PCR products from the first PCR, using 10 based-pair multiplex identifiers (MID) added to the primers at 5' position to specifically identify each sample. Similarly, fungal composition was estimated by 454 pyrosequencing of the 18S rRNA. A gene fragment of about 350 bp was first amplified using the primers FR1 and FF390. Then, a second PCR was run on purified PCR products from the first PCR, using 10 based-pair multiplex identifiers (MID) added to the primers at 5' position. The PCR products were finally purified and pyrosequencing was then carried out on a GS Junior (Roche 454 Sequencing System).

Bioinformatics analysis

A bioinformatics analysis was done using the GnS-Pipe of the GenoSol platform as described by Terrat et al. (2012). First, all the 16S and 18S raw reads were sorted according to the multiplex identifier sequences. The raw reads were then filtered and deleted based on: (a) their length, (b) their number of ambiguities (Ns), (c) and their primer(s) sequence(s). A PERL program was then applied for rigorous dereplication (i.e., clustering of strictly identical sequences). The dereplicated reads were then aligned using infernal alignment and clustered into operational taxonomic units (OTU) using a PERL program that groups rare reads to abundant ones, and does not count differences in

Table 1 Physicochemical characteristics and concentration of trace metal elements in studied soils (0–20 cm)

Year	Clay g/kg	Silt	Sand	Org. C	Tot. N	C/N	pH	CaCO ₃ g/kg	Fe	Zn mg/kg	Pb	Cu	Cd
P1 2011	80 ± 7	112 ± 3	808 ± 6	68.9 ± 14.8	2.5 ± 0.2	27.0 ± 3.4	7.6 ± 0.1	42.3 ± 6.3	15.2 ± 1.3	581 ± 52	389 ± 113	184 ± 36	2.55 ± 0.32
P6				62.0 ± 11.3	2.0 ± 0.2	30.0 ± 4.6	7.6 ± 0.0	28.1 ± 7.7	15.9 ± 1.6	593 ± 79	344 ± 83	182 ± 24	2.73 ± 0.41
P8 2009				39.3 ± 4.9	1.7 ± 0.2	22.8 ± 0.5	7.6 ± 0.0	26.8 ± 5.4	13.0 ± 1.1	568 ± 85	326 ± 62	159 ± 20	2.65 ± 0.27
2011				45.4 ± 5.0	1.9 ± 0.1	23.4 ± 1.0	7.6 ± 0.0	32.0 ± 5.0	14.6 ± 0.6	574 ± 42	397 ± 137	173 ± 14	2.82 ± 0.10

homopolymer lengths. A filtering step was then carried out to check all single singletons (reads detected only once and not clustered, which might be artifacts, such as PCR chimeras) based on the quality of their taxonomic assignments. Finally, in order to compare the datasets efficiently and avoid biased community comparisons, the retained reads were homogenized by random selection closed to the lowest dataset. The retained high-quality reads (3044 for bacteria and 6467 for fungi) were used for taxonomy-based analysis using similarity approaches against dedicated reference databases from SILVA (version r111 using the EMBL taxonomy). The raw datasets are available on the EBI database system under project accession number PRJEB9069.

Statistical analyses

For the synchronic study, the bacterial and fungal community structures of soil samples from P1 and P6 were characterized using Bray–Curtis distances calculated from the matrix of OTU. Non-metric multi-dimensional scaling (NMDS) was applied to graphically depict differences between microbial communities. Analysis of SIMilarity (ANOSIM, 999 permutations) was used to test the significance of the observed clustering of samples on the ordination plot according to land use. For the diachronic study, the bacterial and fungal community structures of these soil samples for the years 2009, 2010, and 2011 were characterized using Bray–Curtis distances calculated from the OTU's matrix. Non-metric multi-dimensional scaling (NMDS) was applied under R software to graphically depict any differences between these bacterial and fungal communities. Analysis of SIMilarity (ANOSIM, 999 permutations) was used to test the significance of the observed clustering of samples on the ordination plot according to the year of experiment.

Results and discussion

On the Pierrelaye site, irrigation with wastewater led to an important accumulation of recalcitrant organic matter (high C:N ratio between 23 and 30) and metal elements, which was previously described by Lamy et al. (2006) (Table 1). In a previous study, we have designed synchronic and diachronic studies to demonstrate a positive effect of *Miscanthus* crop on the bacterial and fungal diversity in terms of number of taxons and evenness (Bourgeois et al. 2015). The goal of the present work is to identify precisely the bacterial and fungal populations stimulated by *Miscanthus* crop and to deduce the microbial functions that may be potentially restored.

Influence of wastewater irrigation on soil microbiological composition

Detailed analysis of the bacterial composition in the different plots revealed similar patterns of population structure dominated by genera such as *Pedomicrobium*, *Hyphomicrobium*, *Massilia*, and *Flavisolibacter* known to be resistant to heavy metals or organic micropollutants and characteristic of contaminated soils (Fig. 1a, c) (Girvan et al. 2005; Hong et al. 2015). Moreover, bacteria belonging to the genus *Holophaga* (relative abundance from 6 to 12 %) are known to be involved in sulfide methylation of metals and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation (Rosenzweig et al. 2013), whereas those belonging to genus *Steroidobacter* (from 4.3 to 4.9 %) are involved in hormone degradation (Fahrbach et al. 2008). Fungal communities were also impacted by organic matter quality and the historical site pollution. The fungal community in all plots was dominated by genera belonging to the phylum *Ascomycota*, with *Coniochaeta*, *Fusarium*, and *Chaetomium*, which are known to be metal-tolerant (Fig. 1b, d) (Iram et al. 2009). However, fungi from the phylum *Basidiomycota* were also well represented (from 15 to 20.2 %, data not shown), and these fungi are known to thrive in forest soils because of their ability to degrade recalcitrant organic matter with a high C/N ratio and lignin content (Baldrian and Snajdr 2006). Consequently, the prevalence of such populations in the wastewater-contaminated soils can be explained by the high recalcitrance of soil organic matter observed in the studied plots.

Response of microbial community composition to *Miscanthus* crop

The short-term synchronic comparison of bacterial community taxonomic composition under the 4-year perennial crop, as compared to the conventional cropping plot P6 revealed no significant modifications (ANOSIM significance = 0.256, Fig. 2a). These results were in accordance with those obtained previously at this site with soil bacterial diversity richness and evenness (Bourgeois et al. 2015). A closer examination of the relative abundance of bacterial taxa revealed only a slight increase in Rhizobiales order represented by the stimulation of genus *Burkholderia* under *Miscanthus* crops (about 3.6 % relative abundance for P1 samples compared to 2.6 % relative abundance for P6 soils, Fig. 1a). Bacteria belonging to this genus are reported to be root-linked, metal-tolerant, and also involved in N and C cycling through their strong catabolic versatility and lytic abilities, which enables them to degrade a wide range of C-compounds including various biomacromolecules (Suárez-Moreno et al. 2012). All these attributes suggest a

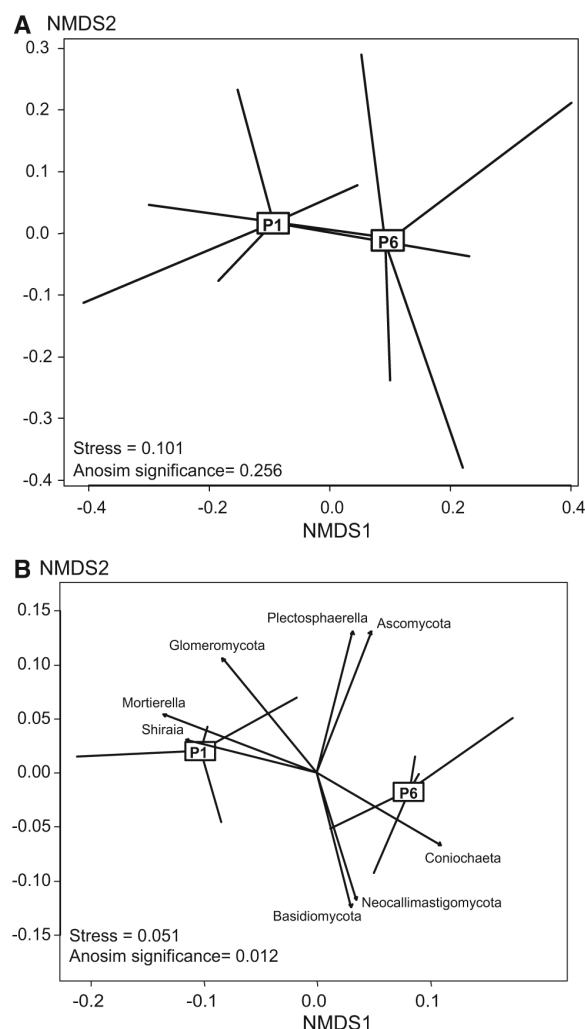


Fig. 2 Non-metric multi-dimensional scaling (NMDS) ordination plots derived from Bray–Curtis distances calculated from the matrix of **a** bacterial and **b** fungal OTU (taxons) for P1 plot and P6 plots. The stress values for all plots were lower than 0.10 which indicates that these data were well represented by the two-dimensional representation. *Vectors* in the bi-plot overlay were constructed from a matrix containing the relative abundances of microbial phyla and genera recovered in more than 1 %. Only correlations ≤ 0.05 were included for bacteria and fungi. The angle and length of the vector indicate the direction and strength of the variable

restoration of plant–microbe interactions and organic matter mineralization leading to a stimulation of crop biomass production not only by enhancing soil fertility but also by increasing plant metal tolerance (Guo et al. 2011).

Concerning fungal 18S rRNA gene sequencing, significant shifts in fungal taxonomic composition occurred between annual and perennial cropping (ANOSIM significance = 0.012, Fig. 2b). This observation was in agreement with previous results revealing a positive effect of

Miscanthus crop on fungal community diversity richness (Bourgeois et al. 2015). More precisely, fungi belonging to the genus *Mortierella* were increased under the *Miscanthus* crop (6.4 % for P1 compared with 4.7 % for P6, Fig. 1b). These fungi are highly opportunistic and are known to degrade fresh organic matter, thus providing readily available nutrients for plants and organisms. Tardy et al. (2015) showed that *Mortierellaceae* proliferate during the initial phase of crop litter decomposition due to their rapid growth on simple organic matter. In our case, the stimulation of *Mortierella* may reflect an increase in easily decomposable C-substrates in the soil, consistent with an enhanced release of root exudates by the perennial *Miscanthus* crop. Finally, the phylum *Glomeromycota* was also more prevalent under *Miscanthus* crop than under the conventional crop system (2.2 % relative abundance for P1 compared to 0.7 % for P6, data not shown). These arbuscular mycorrhizal fungi live in symbiosis with plants through their root systems, providing a higher intake of nutrients for plant growth with a direct impact on crop productivity, and also a higher resistance against soil pathogens (Smith and Read 2008).

Our synchronic study demonstrated that 4 years of *Miscanthus* perennial cropping, had no significant impact on the bacterial community, but led to a shift in fungal community diversity and composition. Such discrepancy may reflect that perennial *Miscanthus* cropping is also associated with halting of agricultural practices such as tillage known to affect mainly fungal communities. The stimulation of root-associated genera suggests that *Miscanthus* cropping is beneficial to the re-establishment of ecological interactions between plant and soil communities in contaminated soils, which could in turn provide potential advantages for plant growth and crop production.

Dynamics of microbial composition during the implantation of *Miscanthus* crop

Diachronic monitoring was carried out in the P8 plot, planted with Giant *Miscanthus*, from 2009 to 2011 to follow the dynamics of soil microbial taxonomic composition. During this period, similarity analyses of the bacterial taxonomic composition revealed significant differences between 2009 and 2010 and between 2010 and 2011 ($p = 0.003$, Fig. 3a). From 2009 to 2010, the relative abundance of *Nitrospira* bacteria increased (4.9 % in 2010 compared with 3.5 % in 2009, Figs. 1c). These nitrite-oxidizing bacteria play an important role in nitrogen turnover and availability (Dionisi et al. 2002), which is of major importance at this site where the organic matter is rather recalcitrant (C:N up to 28.5) and nitrogen poorly available. As nitrogen availability is often a limiting factor for plant growth and controls key aspects of the carbon cycle

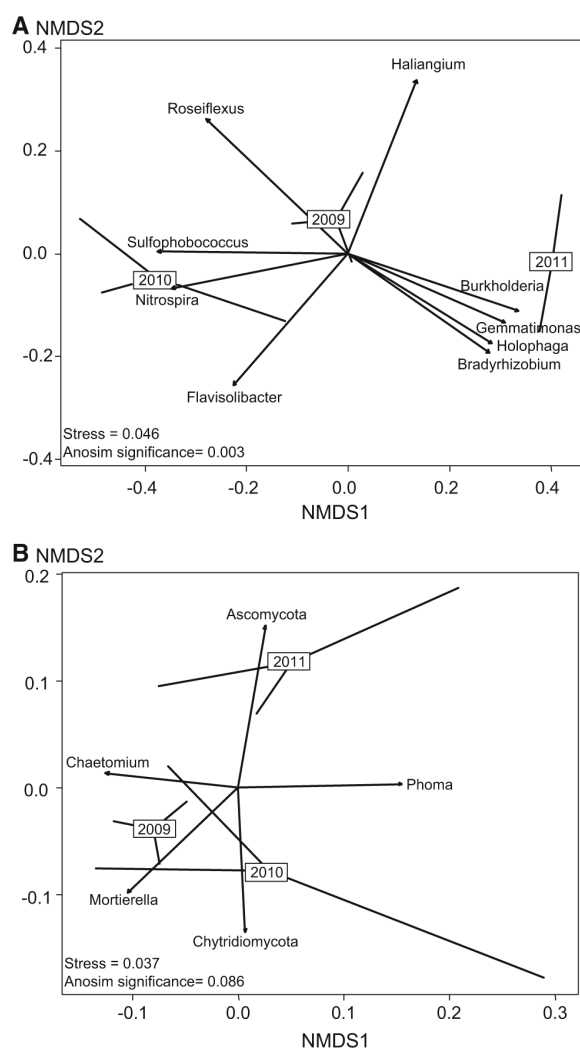


Fig. 3 Non-metric multi-dimensional scaling (NMDS) ordination plots derived from Bray–Curtis distances calculated from the matrix of **a** bacterial and **b** fungal OUT (taxons) for the P8 plots for years 2009, 2010 and 2011. The stress values for all plots were lower than 0.05 which indicates that these data were well represented by the two-dimensional representation. Vectors in the bi-plot overlay were constructed from a matrix containing the relative abundances of microbial genera recovered in more than 1 %. Only correlations ≤ 0.05 were included for bacteria and fungi. The angle and length of the vector indicate the direction and strength of the variable

(Gruber and Galloway 2008), an increase in these bacteria could lead to a higher availability of nutrients for other organisms and for crop production. From 2010 to 2011, important decreases in the relative abundance of genera characteristic of polluted soils, such as *Sulfophobococcus* (belonging to the Archaea and generally found in anaerobic treatments of wastewater) and *Flavisolibacter* (common dominant genus in soils heavily polluted with metals), were observed, whereas other were increased, such as

Gemmatimonas (± 3.15 % in 2011 compared with ± 1.68 % in 2009), *Burkholderia* (± 3.11 % in 2011 compared with ± 1.20 % in 2009), *Azospira* (± 2.92 % in 2011 compared with ± 1.36 % in 2009), and *Bradyrhizobium* (± 1.44 % in 2011 compared with ± 1.04 % in 2009; Fig. 1c). All these genera are also involved in organic matter mineralization and the nitrogen cycle. In addition, both *Burkholderia* and *Bradyrhizobium* live in the close vicinity of plant roots with which they have strong interactions (Suárez-Moreno et al. 2012; Guo et al. 2011; Bottomley et al. 1994). As previously revealed by the synchronic study, the identity of the stimulated populations indicate that *Miscanthus* cropping may help to restore soil ecological quality by re-establishing biotic interactions between the plant and the soil microbial community and by re-initiating the transformations of the C and N cycles.

NMDS analysis of the fungal sequence datasets showed that no significant differences in community composition occurred between 2009, 2010 and 2011 (ANOSIM $p = 0.086$, Fig. 3b). However, slight modifications did appear in 2011, highlighting a tendency for the relative abundance of the phylum *Ascomycota* to increase under *Miscanthus* crop (66.95 % compared with 54.42 % in 2009, data not shown). The increase in this phylum resulted from the stimulation of saprotrophic genera belonging to *Plectosphaerella*, *Capronia*, and *Penicillium*, which are known to benefit from inputs of fresh and easily degradable organic matter such as that provided by Giant *Miscanthus* cropping with time (Fig. 1d) (Allen et al. 2003; Baldrian et al. 2011). This observed stimulation in 2011 of *Ascomycota* fungi, a phylum known to be prevalent on non-polluted agricultural soils, could reflect an increase in fungal activity associated with organic matter mineralization and therefore indicate a renewed rehabilitation of biological activity and fertility in these polluted soils (Lienhard et al. 2014).

The synchronic and diachronic evaluations of the effect of *Miscanthus* bio-energy cropping on the microbial community in a long-term wastewater-contaminated site highlighted positive effects on microbial community composition and soil biological quality. The shifts in microbial composition resulted systematically from the stimulation of populations involved in plant root association and in nutrient cycling. This suggests that *Miscanthus* crop may induce a restart of biotic interactions between plants and organisms as well as of organic matter mineralization and nitrogen cycle. This shift in community composition could lead to the improvement in soil organic matter turnover, which is low in these soils due to the high C:N ratio, and therefore to an increased release of nutrients necessary for plant growth and microbial activity. Our results demonstrate that planting a perennial *Miscanthus* bio-energy crop on contaminated soils may be considered

as a good strategy for the rehabilitation of polluted sites and their subsequent agricultural use.

Acknowledgments This work was partly supported by an ANR-08-CESA-012 grant for the Resacor project from the French National Research Agency. The authors thank B Brouant (Chambre Interdépartementale d'Agriculture d'Ile de France) for the setup of *Miscanthus* plots, Mr Leconte (farmer) for the setup of other cropping systems and providing easy access, and J.P. Pétraud (INRA, UMR 1402) for marking and maintenance of the experimental site. This work, through the involvement of technical facilities of the GenoSol platform of the infrastructure ANAEE, France, received a grant from the French state through the National Agency for Research under the program "Investments for the Future" (reference ANR-11-INBS-0001), as well as a grant from the Regional Council of Burgundy.

References

- Allen TR, Millar T, Berch SM, Berbee ML (2003) Culturing and direct DNA extraction find different fungi from the same ericoid mycorrhizal roots. *New Phytol* 160:255–272. doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00885.x
- Bååth E, Díaz-Raviña M, Frostegård A, Campbell CD (1998) Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Appl Environ Microbiol* 64:238–245
- Baldrian P, Snajdr J (2006) Production of ligninolytic enzymes by litter-decomposing fungi and their ability to decolorize synthetic dyes. *Enzyme Microb Technol* 39:1023–1029. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.02.011
- Baldrian P, Voříšková J, Dobiášová P, Merhautová V, Lisá L, Valášková V (2011) Production of extracellular enzymes and degradation of biopolymers by saprotrophic microfungi from the upper layers of forest soil. *Plant Soil* 338:111–125. doi:10.1007/s11104-010-0324-3
- Bottomley PJ, Cheng HH, Strain SR (1994) Genetic structure and symbiotic characteristics of a *Bradyrhizobium* population recovered from a pasture soil. *Appl Environ Microbiol* 60:1754–1761
- Bourgeois E, Dequiedt S, Lelièvre M, van Oort F, Lamy I, Maron PA, Ranjard L (2015) Positive effect of the *Miscanthus* bioenergy crop on microbial diversity in wastewater-contaminated soil. *Environ Chem Lett*. doi:10.1007/s10311-015-0531-5
- Chauvat M, Perez G, Hedde M, Lamy I (2014) Establishment of bioenergy crops on metal contaminated soils stimulates below-ground fauna. *Biomass Bioenergy* 62:207–211. doi:10.1016/j.biombioe.2014.01.042
- Dionisi HM, Layton AC, Harms G, Gregory IR, Robinson KG, Sayler GS (2002) Quantification of *Nitrosomonas oligotropha*-like ammonia-oxidizing bacteria and *Nitrospira* spp. from full-scale wastewater treatment plants by competitive PCR. *Appl Environ Microbiol* 68:245–253. doi:10.1128/AEM.68.1.245-253.2002
- Evangelou MWH, Conesa HM, Robinson BH, Schulin R (2012) Biomass production on trace element-contaminated land: a review. *Environ Eng Sci* 29:823–839. doi:10.1089/ees.2011.0428
- Fahrbach M, Kuever J, Remesch M, Huber BE, Kämpfer P, Dott W, Hollender J (2008) *Steroidobacter denitrificans* gen. nov., sp. nov., a steroidal hormone-degrading gammaproteobacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:2215–2223. doi:10.1099/ijs.0.65342-0
- Girvan MS, Campbell CD, Killham K, Prosser JI, Glover LA (2005) Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environ Microbiol* 7:301–313. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00695.x
- Gruber N, Galloway JN (2008) An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature* 451:293–296. doi:10.1038/nature06592
- Guo J, Tang S, Ju X, Ding Y, Liao S, Song N (2011) Effects of inoculation of a plant growth promoting rhizobacterium *Burkholderia* sp. D54 on plant growth and metal uptake by a hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance grown on multiple metal contaminated soil. *World J Microbiol Biotechnol* 27:2835–2844. doi:10.1007/s11274-011-0762-y
- Hedde M, van Oort F, Renouf E, Thénard J, Lamy I (2013) Dynamics of soil fauna after plantation of perennial energy crops on polluted soils. *Appl Soil Ecol* 66:29–39. doi:10.1016/j.apsoil.2013.01.012
- Hidri Y, Bouziri L, Maron PA, Anane M, Jedidi N, Hassan A, Ranjard L (2010) Soil DNA evidence for altered microbial diversity after long-term application of municipal wastewater. *Agron Sustain Dev* 30:423–431. doi:10.1051/agro/2009038
- Hong C, Si Y, Xing Y, Li Y (2015) Illumina MiSeq sequencing investigation on the contrasting soil bacterial community structures in different iron mining areas. *Environ Sci Pollut Res*. doi:10.1007/s11356-015-4186-3
- <http://www.agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/primeur292.pdf>
- Iram S, Ahmad I, Stuben D (2009) Analysis of mines and contaminated agricultural soil samples for fungal diversity and tolerance to heavy metals. *Pak J Bot* 41:885–895
- Kandeler E, Kampichler C, Horak O (1996) Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biol Fertil Soils* 23:299–306. doi:10.1007/BF00335958
- Lamy I, van Oort F, Dère C, Baize D (2006) Use of major- and trace-element correlations to assess metal migration in sandy Luvisols irrigated with wastewater. *Eur J Soil Sci* 57:731–740. doi:10.1111/j.1365-2389.2005.00765.x
- Lewandowski I, Scurlock JMO, Lindvall E, Christou M (2003) The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. *Biomass Bioenergy* 25:335–361. doi:10.1016/S0961-9534(03)00030-8
- Lienhard P, Terrat S, Chemidlin Prévost-Bouré N, Nowak V, Régner T, Sayphoummie S, Panyasiri K, Tivet F, Mathieu O, Levêque J, Maron PA, Ranjard L (2014) Pyrosequencing evidences the impact of cropping on soil bacterial and fungal diversity in Laos tropical grassland. *Agron Sustain Dev* 34:525–533. doi:10.1007/s13593-013-0162-9
- Pavel P-B, Puschenreiter M, Wenzel WW, Diacu E, Horia Barbu C (2014) Aided phytostabilization using *Miscanthus sinensis* × *giganteus* on heavy metal-contaminated soils. *Sci Total Environ* 479–480:125–131. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.01.097
- Ranjard L, Lignier L, Chaussod R (2006) Cumulative effects of short-term polymetal contamination on soil bacterial community structure. *Appl Environ Microbiol* 72:1684–1687. doi:10.1128/AEM.72.2.1684-1687.2006
- Rosenzweig N, Bradeen JM, Tu ZJ, McKay SJ, Kinkel LL (2013) Rhizosphere bacterial communities associated with long-lived perennial prairie plants vary in diversity, composition, and structure. *Can J Microbiol* 59:494–502. doi:10.1139/cjm-2012-0661
- Smith SE, Read DJ (2008) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, San Diego
- Suárez-Moreno ZR, Caballero-Mellado J, Coutinho BG, Mendonça-Previato L, James EK, Venturi V (2012) Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated *Burkholderia*. *Microb Ecol* 63:249–266
- Tamtam F, van Oort F, LeBot B, Dinh Mompelat S, Chevreuil M, Lamy I, Thiry M (2011) Assessing antibiotic contamination in metal contaminated soils four years after cessation of long-term waste water irrigation. *Sci Total Environ* 409:540–547. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.10.033
- Tardy V, Chabbi A, Charrier X, de Berranger C, Reignier T, Dequiedt S, Faivre-Primot C, Terrat S, Ranjard L, Maron PA (2015) Land use history shifts in situ fungal and bacterial successions following wheat straw input into the soil. *PLoS One* 10:e0130672

- Terrat S, Christen R, Dequiedt S, Lelièvre M, Nowak V, Regnier T, Bachar D, Plassart P, Wincker P, Jolivet C, Bispo A, Lemanceau P, Maron PA, Mougél C, Ranjard L (2012) Molecular biomass and MetaTaxogenomic assessment of soil microbial communities as influenced by soil DNA extraction procedure. *Microb Biotechnol* 5:135–141. doi:[10.1111/j.1751-7915.2011.00307.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00307.x)
- van Oort F, Jongmans AG, Lamy I, Baize D, Chevallier P (2008) Impacts of long-term waste-water irrigation on the development of sandy Luvisols: consequences for metal pollutant distributions. *Eur J Soil Sci* 59:925–938. doi:[10.1111/j.1365-2389.2008.01047.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2008.01047.x)

Chapitre IV :
**Réponse des bioindicateurs aux
changements du travail du sol et de la
gestion des résidus de culture**

Un enjeu majeur dans un contexte agroécologique est de remédier à l'intensification des pratiques agricoles. En effet l'intensification des pratiques effectuée depuis une soixantaine d'années avec le développement des systèmes de grandes cultures a contribué à une importante perte de biodiversité expliquée, notamment, par une baisse de qualité et de quantité des ressources disponibles pour les organismes (Turbé et al., 2010; Helgason et al., 1998). Cette biodiversité étant à la base de nombreux services d'approvisionnement et de régulation de nos écosystèmes, il devient nécessaire de repenser les systèmes de production agricole. Cette étude se situe donc dans un contexte de gestion des agrosystèmes cultivés afin de mesurer l'impact de pratiques agricoles variant par le travail du sol, la gestion des résidus de culture et le type de culture en place, sur les communautés vivantes du sol et notamment les microorganismes, et les services rendus notamment sur la disponibilité des nutriments pour la production agricole.

Dans ce contexte, ce Chapitre IV se propose d'évaluer :

- 1) à l'échelle de la parcelle, l'impact de cinq traitements agricoles sur l'abondance et la diversité taxonomique des communautés bactériennes et de champignons,
- 2) la différenciation des communautés bactériennes et de champignons en fonction de la profondeur d'échantillonnage afin de mettre en évidence les conséquences d'un travail réduit du sol.

Ce Chapitre IV consiste donc à suivre la réponse de la biomasse moléculaire microbienne et de la diversité taxonomique des communautés bactériennes et de champignons à des pratiques agricoles variant par le travail du sol (labour *vs.* travail réduit) la gestion des résidus de culture (restitution *vs.* exportation) et le type de culture (pérenne avec plantation de Switchgrass *vs.* annuelle avec rotation de cultures) sur un essai à court terme, après seulement quatre années de différenciation des traitements. Elle répond aux enjeux concernant la viabilité des écosystèmes productifs gérés à des fins de production alimentaire ou énergétique tenant compte du maintien de services écosystémiques et de la préservation et l'utilisation durable de la biodiversité. Cette étude fait partie du projet SOFIA financé par l'ANR Agrobiosphère et dirigé par Sylvie Recous (UMR FARE INRA Reims). Elle s'appuie sur un Système d'Observation et d'Expérimentation sur le long terme pour la Recherche en Environnement (SOERE) - Agroécosystèmes, Cycles biogéochimiques et Biodiversité (ACBB) situé à Estrées-Mons en Picardie conçu pour étudier l'évolution des systèmes de grandes cultures et suivre l'introduction de cultures pour fournir de la biomasse énergétique.

1. Introduction

Afin d'augmenter la productivité par hectare et maximiser les performances économiques des exploitations agricoles, l'agriculture a connu une intensification de ces pratiques ces dernières décennies. Cette intensification a été effectuée par une application accrue de fertilisants et de pesticides (99635 tonnes de produits phytosanitaires répandues en 2001 sur les SAU françaises, INRA), une augmentation de l'irrigation des parcelles avec des eaux usées, mais aussi par une mécanisation du travail du sol et une modification des régimes de production (Bonnefond, 1970; Tilman et al., 2002). Ces pratiques ont conduit à une dégradation des agrosystèmes à grande échelle due à une accumulation des pesticides dans les sols et une dégradation de la quantité/qualité des ressources disponibles pour les organismes vivants dans les sols (Foley et al., 2005; Helgason et al., 1998; Tilman et al., 2002; Turbé et al., 2010).

Le sol est le support des cultures. Il présente une structure hétérogène, permet de stocker des éléments nutritifs, a un rôle de tampon vis-à-vis des perturbations environnementales et il héberge également une grande quantité et diversité d'organismes vivants (Gobat et al., 2010; Mummey et al., 2006). Cette biodiversité est à la base des services d'approvisionnement et de régulation de nos écosystèmes (Altieri, 1999; Turbé et al., 2010). Elle agit donc directement sur le développement et le bien être des sociétés humaines. A l'heure actuelle, l'intensification agricole est perçue comme l'une des plus grandes menaces pour la biodiversité des sols (Butchart et al., 2010; Duraiappah et al., 2005). Dans un contexte où l'agriculture dégrade les fonctions biologiques des sols et les services qu'ils peuvent rendre, il devient nécessaire de repenser notre modèle agricole. Ces prises de conscience ont conduit au développement d'un domaine, l'agroécologie, afin de définir de nouveaux modes de gestion et de concilier les enjeux économiques tout en maintenant les services écosystémiques, préservant et utilisant durablement la biodiversité des sols.

Dans les agro-écosystèmes, la gestion des pratiques ajoute un autre niveau de complexité aux forces structurant la biodiversité du sol. Un des paramètres les plus dévastateur des surfaces cultivées et perturbateur pour les sols et leur biodiversité est le labour. En effet les sols labourés, mis à nus, sont en contact direct du vent et de l'eau, entraînant leur érosion, une diminution de la teneur en matière organique du sol et du stockage du carbone (Lal & Kimble, 1997). Ils présentent des organismes en plus faibles quantités dues à la perturbation de la structure des sols (Aslam et al., 1999; Turbé et al., 2010;

Wright et al., 2005). Ces perturbations entraînent une diminution des ressources disponibles pour la croissance végétale et conduisent à une diminution de leur biomasse et donc à une baisse de la productivité agricole à long terme. Bien que néfaste, le labour permet de réduire la présence des plantes adventices dans les champs et de diminuer la transmission des maladies par les résidus de culture d'une année à l'autre (Berner et al., 2008). Une réduction du travail du sol impacte les propriétés physiques comme la structure du sol et sa stabilité, l'infiltration de l'eau, mais également les propriétés biologiques comme la structure et le fonctionnement des communautés microbiennes (Holland, 2004; Tebrügge et al., 1999). De nombreuses études ont également été menées sur l'importance de la gestion des résidus de culture sur les microorganismes telluriques. En effet les résidus laissés à la surface du sol permettent l'apparition d'un habitat favorable aux microorganismes dont le nombre, la diversité et l'activité augmentent souvent (Babujia et al., 2010; Holland & Coleman, 1987; Pascault et al., 2010; Purakayastha et al., 2009).

Les communautés microbiennes telluriques sont principalement composées de bactéries et de champignons. Ces microorganismes sont très nombreux et très diversifiés (Curtis & Sloan, 2005). Dans un gramme de sol l'abondance moyenne des microorganismes est d'environ 10^9 individus et leur biodiversité s'élève entre 10^3 et 10^6 espèces (Torsvik & Øvreås, 2002). Ces microorganismes rendent de nombreuses fonctions écosystémiques. En effet, ils décomposent et minéralisent la matière organique des sols afin de la rendre disponible pour les plantes, ils recyclent ainsi le carbone et les nutriments minéraux (azote, phosphore, potassium) (Barrios, 2007; Hallin et al., 2009; Paul, 2014). Ils sont également impliqués dans la structuration du sol par la formation d'agrégats (Ashraf et al., 2013; Tang et al., 2011; Verbruggen et al., 2010). Différentes études ont démontrées leur sensibilité aux pratiques agricoles et aux changements de mode d'usage des sols (Bourgeois et al., 2015; Constancias et al., 2014, 2015; Dequiedt et al., 2011; Kushwaha et al., 2000; Yao et al., 2000). Ce sont donc de bons indicateurs pour évaluer l'évolution positive ou négative de nouveaux systèmes de culture dans un contexte agroécologique.

Dans ce contexte, les objectifs de cette étude ont été de mesurer l'impact à court terme de cinq traitements agricoles variant par le type de culture (culture pérenne de Switchgrass vs. annuelle avec rotations), le travail du sol (labour vs. travail réduit), la gestion des résidus de culture (restitution vs. export) et la fertilisation azotée sur les communautés de bactéries et de champignons des sols en termes d'abondance et de diversité taxonomique. L'étude a été réalisée sur le site du SOERE ACBB situé à Estrées-Mons en Picardie. Les communautés

microbiennes ont été caractérisées en 2010 sur l'horizon de sol 0-20 cm avant le commencement de l'essai et en 2014 après quatre ans de différenciation de cinq traitements agricoles sur les horizons de sol 0-5 cm et 5-20 cm afin d'exacerber l'impact du travail du sol. Le traitement T1 comprend un labour et une restitution des résidus, le T2 un travail réduit et une restitution des résidus, le T3 un travail réduit et une exportation des résidus, le T4 un labour avec restitution des résidus et un faible apport azoté, et le traitement T6 une culture pérenne de switchgrass, qui est une plante en C4 intéressante pour la production de biocarburants (Adler et al., 2006; Parrish & Fike, 2005). Les communautés ont été décrites en termes de biomasse moléculaire microbienne, d'indices de diversité (richesse, équitabilité, Shannon), de structure et de composition taxonomique des communautés bactériennes et de champignons. A l'état initial, les communautés de bactéries et de champignons du site sont attendues comme homogènes puisqu'aucun traitement n'a encore impacté les microorganismes du site. Après quatre années de différenciation des traitements, les communautés bactériennes et de champignons sous culture pérenne de switchgrass (T6) devraient être très différenciées des communautés sous rotation de cultures annuelles avec une augmentation de l'abondance des populations liées aux racines de la plante. Les communautés sous travail réduit (T2 et T3) sont attendues comme discriminées en fonction de l'horizon de sol étudié. Elles sont également attendues discriminées des communautés sous labour (T1 et T4). Le labour étant une pratique délétère pour le sol, la biomasse moléculaire microbienne et les indices de diversité bactériens mais surtout de champignons sont attendus comme inférieurs aux valeurs des autres traitements.

2. Matériels et méthodes

2.1. Présentation du site expérimental

L'étude a été réalisée sur le site du SOERE ACBB situé dans la plaine du Santerre à Estrées-Mons en Picardie (N 49° 52' 32.423", E 3° 1' 53.839"). L'essai a été mis en place en 2009 après deux ans « d'homogénéisation » des sols. Cette homogénéisation a consisté à planter du blé d'hiver, de l'orge de printemps et les sols ont été labourés (Tableau IV.1). L'étude a débuté en 2010 (état initial) et a été suivie pendant cinq ans (jusqu'à 2014). En 2010, cinq traitements ont été agencés faisant varier la rotation culturale (rotation de cultures annuelles vs culture pérenne à vocation énergétique (Switchgrass)), le travail du sol, la gestion des résidus de culture et la fertilisation azotée (Tableaux IV.1 & IV.2). Le site est composé de

quatre blocs comprenant six parcelles, chaque bloc comprenant une répétition de traitement (Figure IV.1). Au total vingt parcelles constituent le dispositif.

		Traitements					
Années	Types de culture	T1	T2	T3	T4	T6	
2008/2009 homogénéisation du site	Culture	Labour / Blé d'hiver					
	Culture intermédiaire	x					
	Culture	Labour / Orge printemps					
	Culture intermédiaire	Moutarde					
2010	Culture	Pois protéagineux printemps					Switchgrass (culture pérenne)
	Culture intermédiaire	x					
2011	Culture	Blé tendre hiver					
	Culture intermédiaire	x					
2012	Culture	Colza hiver					
	Culture intermédiaire	Moutarde					
2013	Culture	Orge printemps					
	Culture intermédiaire	Avoine diploïde					
2014	Culture	Maïs					
	Culture intermédiaire	x					

Tableau IV.1. Rotations de cultures effectuées sur le dispositif expérimental SOERE ACBB d'Estrées-Mons

	T1	T2	T3	T4	T6
Travail du sol	Labour	Superficiel	Superficiel	Labour	Non travail
Gestion des résidus de culture	Restitution	Restitution	Exportation	Restitution	Exportation
Fertilisation azotée	N	N	N	N (-50%)	N

Tableau IV.2. Présentation des 5 traitements étudiés sur le dispositif expérimental SOERE ACBB d'Estrées-Mons

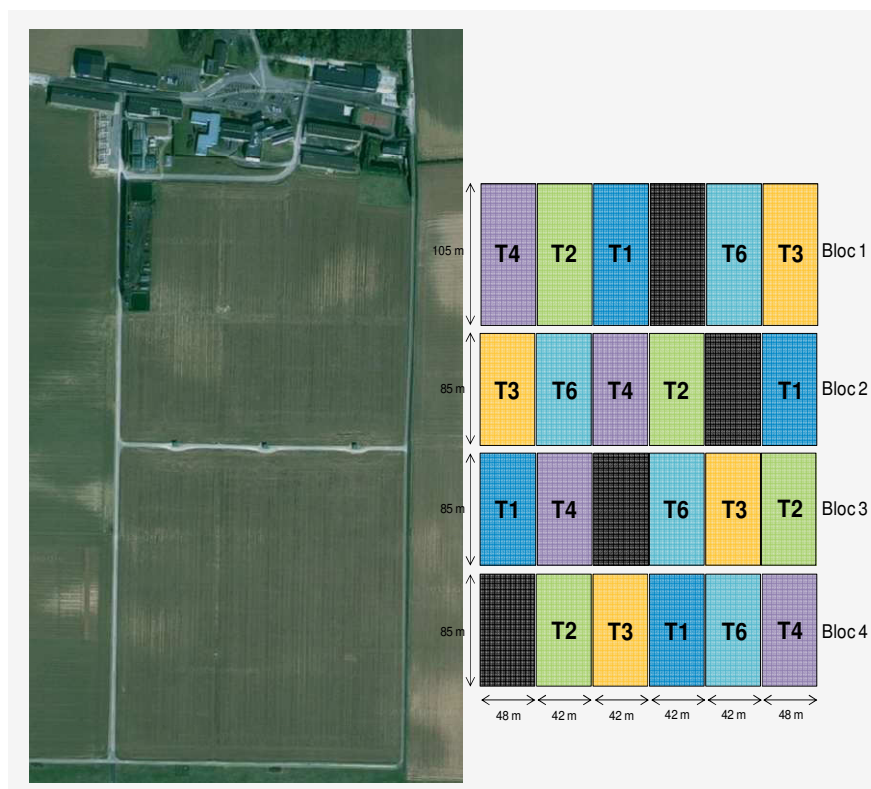


Figure IV.1. Plan du dispositif expérimental SOERE ACBB d'Estrées-Mons

2.2. Stratégies d'échantillonnage

A l'état initial du site en Mars 2010, 5 échantillons de sol ont été prélevés sur chaque parcelle au niveau de l'horizon 0-20 cm correspondant à la couche de labour (Figure IV.2). Au total, 120 échantillons de sol ont été prélevés et analysés. Afin de différencier les communautés microbiennes selon les traitements à la fin de l'essai en 2014, un échantillonnage stratifié a été réalisé, consistant à analyser séparément les horizons 0-5 cm et 5-20 cm pour chaque traitement. Le choix de cet échantillonnage était motivé par la volonté de déterminer si une stratification verticale des communautés intervenait après 4 années d'arrêt ou de réduction du travail du sol, en comparaison du labour connu pour homogénéiser les communautés. Sur chacune des 4 parcelles de chaque traitement, 5 échantillons de sol ont été prélevés respectivement aux deux profondeurs. Pour chaque profondeur, ces 5 échantillons ont ensuite été poolés pour obtenir un échantillon composite représentatif de chaque parcelle. Au total, 40 échantillons de sol ont été prélevés et analysés. Tous les échantillons ont été tamisés à 4 mm, lyophilisés (-80°C) et conservés à -40°C au sein du conservatoire de la plateforme GenoSol (INRA Dijon, http://www2.dijon.inra.fr/plateforme_genosol/plateforme-genosol).

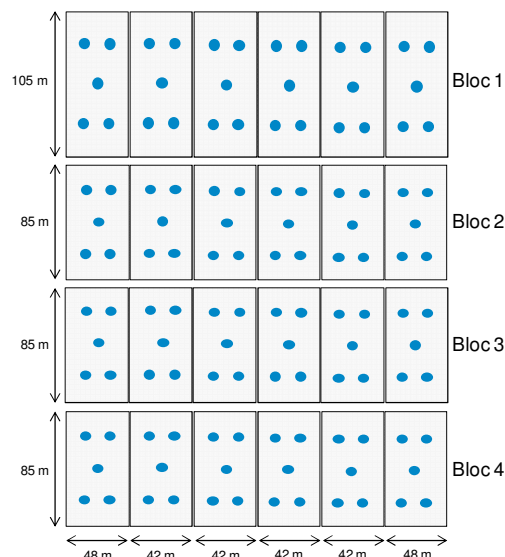


Figure IV.2. Stratégie d'échantillonnage des sols sur le dispositif expérimental SOERE ACBB d'Estrées-Mons

2.3. Caractéristiques des sols étudiés

Les caractéristiques physico-chimiques des sols ont été déterminées en 2009 pour chaque parcelle (4 valeurs par futur traitement) par le Laboratoire d'Analyse des Sols (INRA Arras, <http://www6.lille.inra.fr/las>) selon les procédures internationales normalisées

(Tableau IV.3). Les sols sont limoneux, de type Orthic-Luvisol (classification FAO). Le pH est basique ($\pm 8,1$) et le rapport C/N paraît optimal puisque la valeur est comprise autour de 10 pour tous les futurs traitements. De façon globale, la texture et les caractéristiques physico-chimiques sont très homogènes sur ce dispositif d'étude.

	Argiles	Limons	Sables	pH	C org.	N tot.	C/N
Traitements	g/kg				g/kg		
T1	20,3 ± 2,1	72,7 ± 3,9	7,0 ± 2,3	8,1 ± 0,1	10,5 ± 0,7	1,06 ± 0,03	9,9 ± 0,5
T2	18,3 ± 4,2	74,5 ± 2,4	7,2 ± 2,4	8,1 ± 0,1	10,2 ± 0,6	1,03 ± 0,02	9,9 ± 0,6
T3	17,4 ± 3,8	74,9 ± 1,3	7,7 ± 2,6	8,1 ± 0,2	10,7 ± 0,8	1,06 ± 0,01	10,2 ± 0,6
T4	20,1 ± 2,2	73,3 ± 1,2	6,6 ± 2,0	8,1 ± 0,1	10,3 ± 0,6	1,03 ± 0,04	9,9 ± 0,6
T6	18,9 ± 2,9	75,3 ± 1,8	5,8 ± 1,2	8,1 ± 0,2	10,3 ± 0,3	1,03 ± 0,03	10,0 ± 0,5

Tableau IV.3. Texture et caractéristiques physico-chimiques des sols étudiés en 2009, (n= 4)

2.4. Analyses moléculaires des communautés microbiennes

2.4.1. Biomasse moléculaire microbienne

L'ADN microbien a été extrait à partir d'un gramme d'échantillon de sol en utilisant une procédure standardisée (Terrat et al., 2012). Les échantillons d'ADN bruts sont révélés par électrophorèse sur un gel d'agarose calibré à 1% avec du bromure d'éthidium et photographiés par une caméra (Biocapt). Une gamme de thymus de veau est incluse sur chaque gel et une courbe standard de concentration d'ADN est utilisée pour estimer la concentration finale d'ADN de l'échantillon brut. L'intensité de fluorescence du bromure d'éthidium est mesurée avec le logiciel ImageQuANT®. Les concentrations d'ADN obtenues sont considérées comme des estimations de la biomasse moléculaire microbienne de chaque échantillon de sol (Dequiedt et al., 2011). Après quantification, les échantillons d'ADN ont été purifiés, comme décrit précédemment (Terrat et al., 2012).

2.4.2. Diversité des bactéries et des champignons

La diversité bactérienne a été estimée par la technique de pyroséquençage 454 de la région V3-V4 de l'ADNr 16S comme décrit par Terrat et al., (2012). Les fragments de gènes (environ 400 pb) ont d'abord été amplifiés avec les amorces F479 et R888. Ensuite une seconde PCR a été effectuée sur ces produits PCR purifiés, en utilisant des MID (identificateurs de multiplexage de 10 pb) ajoutés à la position 5' des amorces pour identifier spécifiquement chaque échantillon. De façon similaire, la diversité des champignons a été estimée par pyroséquençage 454 de l'ADNr 18S. Les fragments de gène d'environ 350 pb ont d'abord été amplifiés en utilisant les amorces FR1 et FF390. Ensuite une seconde PCR a été effectuée pour rajouter les MID sur les amorces en position 5'. Les produits PCR ont

finaleme nt été purifiés et le pyroséque nçage a été effectué par la société GenoScreen (système de séque nçage Roche 454).

2.5. Analyses bioinformatiques

Les analyses bioinformatiques ont été effectuées avec le pipeline GnS-PIPE de la plateforme GenoSol comme décrit dans Terrat et al. (2012). Tout d'abord, toutes les séquences brutes d'ADNr 16S et 18S ont été triées selon les séquences des MID. Les séquences brutes ont ensuite été filtrées et supprimées sur la base de: (a) leur longueur, (b) le nombre de leurs ambiguïtés, (c) et de la séquence de leur(s) amorce(s). Un programme PERL a ensuite été appliqué pour une dé-réplication rigoureuse (c'est-à-dire un regroupement des séquences strictement identiques). Les séquences dé-répliquées ont ensuite été alignées avec Infernal alignement, et regroupées dans des Unités Taxonomiques Operationnelles (OTUs) en utilisant un programme PERL qui regroupe les séquences rares avec les plus abondantes et qui ne compte pas les différences de longueur d'homopolymères. Une étape de filtrage a ensuite été effectuée pour vérifier les single-singletons (séquences rares présentes une seule fois et non regroupées, qui pourraient être des artefacts) sur la base de la qualité de leur assignation taxonomique. Finalement, afin de comparer l'ensemble de données et éviter les biais lors des comparaisons des communautés, les séquences retenues pour chaque échantillon ont été homogénéisées par sélection aléatoire avec le nombre de séquences le plus faible obtenu pour un échantillon. Ici, le nombre de séquences de haute qualité retenu pour les bactéries a été de 4000 et de 7500 pour les champignons. Ces séquences retenues ont été utilisées pour déterminer les indices de richesse et de diversité en utilisant la composition en OTUs définie à 95% de similarité. Le nombre d'OTUs et l'évenness ont été utilisés comme indices de la richesse et de la structure des communautés.

2.6. Analyses statistiques

Une méthode de géostatistique a été utilisée pour cartographier les valeurs de biomasse moléculaire microbienne et caractériser leurs variations spatiales. Conventionnellement dans les analyses géostatistiques, une estimation d'un modèle de variogramme est calculée sur la base des observations qui décrivent la variation spatiale de la propriété d'intérêt. Ce modèle est ensuite utilisé pour prédire la propriété à des endroits non échantillonnés par krigeage (Webster & Oliver, 2010). Le logiciel ArcGis[®] a été utilisé pour effectuer le variogramme et le krigeage.

La biomasse moléculaire microbienne et les indices de diversité (richesse, équitabilité, Shannon) obtenus à l'état initial en 2010 sur l'horizon 0-20 cm, en fonction des 5 traitements agricoles effectués lors de la différenciation en 2014 sur les horizons 0-5 cm et 5-20 cm ont été comparés par analyse des variances (ANOVA, $P < 0,05$) et les différences entre les différents échantillons ont été mesurées par le test de Fisher ($P < 0,05$) à l'aide du logiciel XLSTAT (Addinsoft®).

Les structures des communautés bactériennes et de champignons de l'horizon de sol 0-20 cm avant le commencement de l'essai (2010) ont été caractérisées en utilisant les distances de Bray-Curtis calculées à partir de la matrice OTUs. L'analyse multidimensionnelle non métrique (NMDS) a été appliquée pour représenter graphiquement les différences entre les communautés microbiennes. L'analyse des similarités (ANOSIM, 999 permutations) a été utilisée pour tester la significativité des regroupements observés sur le plan factoriel.

Afin de caractériser la différenciation des communautés de bactéries et de champignons de l'année 2014 sur les horizons de travail du sol 0-5 cm et 5-20 cm, les communautés bactériennes et de champignons de tous les échantillons ont été comparées par le calcul, à partir des matrices OTUs, des distances de Bray-Curtis à l'aide du package vegan du logiciel R®. L'analyse multidimensionnelle non métrique (NMDS) a été appliquée pour représenter graphiquement les différences entre les communautés microbiennes sous R®. L'analyse des similarités (ANOSIM, 999 permutations) a été utilisée pour tester la significativité des regroupements observés sur le plan factoriel. Dû à la grande variabilité des genres bactériens retrouvés, seuls les genres majoritaires retrouvés à plus de 0,3% de la communauté ont été pris en compte pour l'analyse. Pour les champignons, les genres présents à plus de 0,1% de la communauté ont été pris en compte ($p < 0,05$).

3. Résultats et discussion

3.1. Etat initial des communautés microbiennes du site

Au commencement de l'essai en 2010, un état des lieux des communautés microbiennes indigènes a été effectué afin de tester l'homogénéité du site d'étude. Pour cela les communautés de l'horizon de sol 0-20 cm ont été caractérisées en termes d'abondance (biomasse moléculaire microbienne), de diversité taxonomique (indices de richesse, équitabilité, Shannon) et de structure des communautés de bactéries et de champignons.

3.1.1. Biomasse moléculaire microbienne et diversité des bactéries et des champignons

Les 120 valeurs de biomasse moléculaire microbienne ont été spatialisées afin d'obtenir une vision du site avant le commencement de l'essai (Figure IV.3). Ces valeurs de biomasses, comprises entre 14 et 68 μg d'ADN par gramme de sol, sont typiques des sols cultivés (Dequiedt et al., 2011). Le bloc de parcelles « Bloc 2 » est apparu comme présentant une plus forte biomasse microbienne par comparaison avec les trois autres blocs. Toutefois, à l'intérieur de ce bloc, la biomasse mesurée était similaire dans toutes les parcelles.

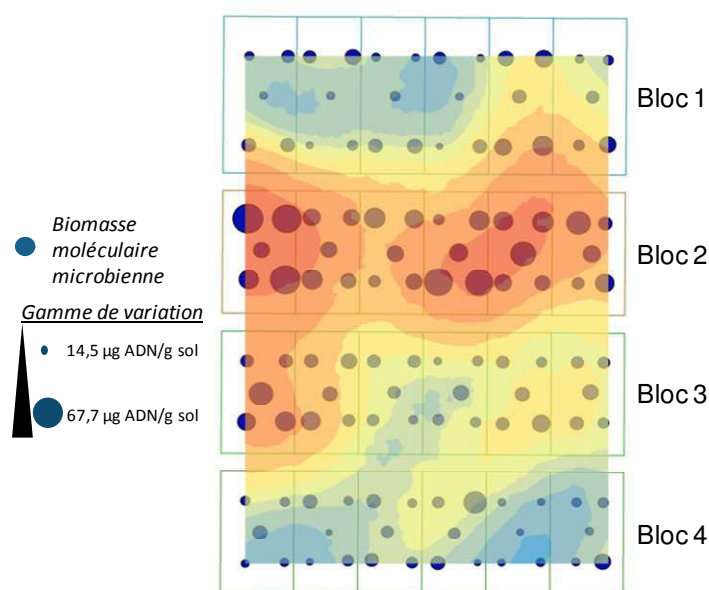


Figure IV.3. Cartographie de la biomasse moléculaire microbienne à l'état initial de l'essai (Mars 2010) avant l'application des cinq traitements

Les cinq échantillons de sol prélevés sur chaque parcelle ont ensuite été poolés pour ne former qu'un seul échantillon composite représentatif de chaque parcelle. La biomasse moléculaire microbienne a été mesurée et les moyennes des quatre répétitions de parcelle obtenues pour chaque futur traitement ont été présentées dans le Tableau IV.4. Les résultats montrent que la valeur moyenne de biomasse est similaire entre les 5 traitements (de 30 et 33 μg d'ADN par gramme de sol). Le site peut donc globalement être considéré comme homogène en ce qui concerne l'abondance microbienne.

Les valeurs des indices de richesse (nombre d'OTUs), d'équitabilité (evenness) et de diversité (Shannon) des communautés de bactéries et de champignons calculées à partir des données de séquençage sont présentées dans le Tableau IV.4. Les valeurs observées sont en adéquation avec les valeurs fréquemment rapportées dans des systèmes agricoles dans d'autres études (Bourgeois et al., 2015; Bourgeois et al., 2015; Constancias et al., 2014,

2015). Comme pour la biomasse moléculaire microbienne, quel que soit l'indice étudié, aucune différence significative n'est apparue entre les communautés des futurs traitements ce qui montre que le site d'étude est homogène.

		T1	T2	T3	T4	T6
Biomasse moléculaire microbienne		33,2 ± 11,0	29,7 ± 11,4	32,8 ± 16,3	30,4 ± 8,3	32,2 ± 7,5
Bactéries	Richesse (nombre d'OTUs)	895 ± 91	909 ± 152	974 ± 154	961 ± 66	805 ± 32
	Evenness	0,83 ± 0,02	0,83 ± 0,02	0,83 ± 0,03	0,83 ± 0,01	0,81 ± 0,01
	Diversité (Shannon)	5,6 ± 0,2	5,6 ± 0,3	5,7 ± 0,3	5,7 ± 0,1	5,4 ± 0,1
Champignons	Richesse (nombre d'OTUs)	750 ± 18	742 ± 14	727 ± 73	713 ± 55	686 ± 11
	Evenness	0,65 ± 0,03	0,61 ± 0,00	0,65 ± 0,01	0,61 ± 0,06	0,62 ± 0,01
	Diversité (Shannon)	4,3 ± 0,2	4,0 ± 0,0	4,3 ± 0,1	4,0 ± 0,4	4,1 ± 0,1

Tableau IV.4. Valeurs de biomasse moléculaire microbienne et des indices de diversité obtenues en 2010 à l'état initial de l'essai. L'analyse des variances a été effectuée par des ANOVA et aucune différence n'est apparue significative entre les échantillons des futurs traitements

3.1.2. Structure des communautés de bactéries et de champignons

Les structures des communautés bactériennes et de champignons en Mars 2010, avant l'application des différents traitements agricoles, ont été représentées sous forme de plans NMDS réalisés à partir des données de séquençage (Figure IV.4). Les résultats ne montrent pas de différence significative de structure des communautés entre les traitements (Anosim > 0,05).

Ce résultat est la garantie que l'hétérogénéité spatiale sur le site d'étude ne masquera pas la différenciation entre les différents traitements qui pourrait intervenir dans le cadre de notre étude.

A partir des résultats obtenus sur la biomasse moléculaire microbienne, les indices de diversité et la structure des communautés bactériennes et de champignons, le site semble globalement homogène avant le commencement de l'essai (*i.e.* les traitements ne sont pas significativement différents pour l'ensemble des indicateurs mesurés) ce qui suggère que l'essai est bien construit pour mettre en évidence des différenciations des communautés microbiennes pouvant intervenir en réponse aux cinq traitements agricoles testés dans ce travail.

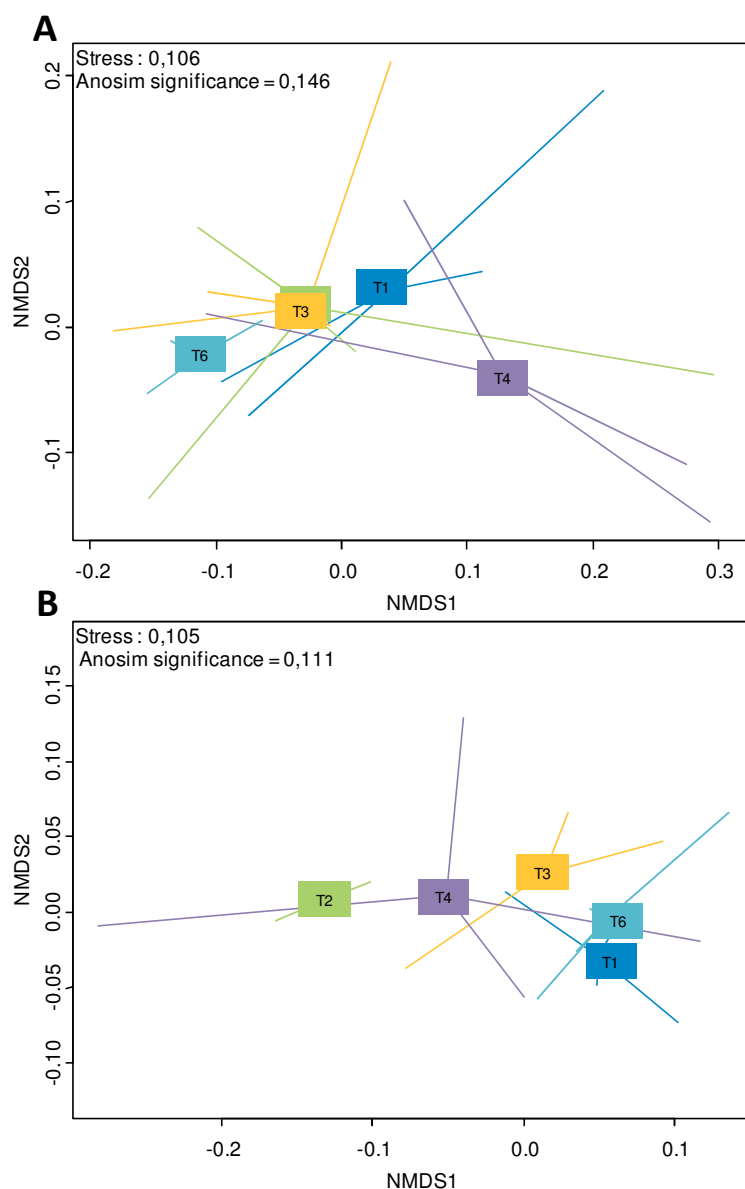


Figure IV.4. Analyses multidimensionnelles non-métriques (NMDS) des communautés bactériennes (A) et de champignons (B) en 2010 à l'état initial de l'essai avant l'application des cinq traitements. Les valeurs de stress sont inférieures à 0,11 ce qui indique que ces données sont bien représentées par la représentation en deux dimensions

3.2. Différenciation des communautés microbiennes en réponse aux différents traitements

Après avoir effectué un contrôle des communautés microbiennes à l'état initial de l'essai en Mars 2010, les objectifs de cette étude ont été de caractériser les communautés bactériennes et de champignons en mars 2014, après avoir été impactées pendant quatre ans par cinq traitements agricoles variant par la culture en place (plante pérenne vs. cultures

annuelles), le travail du sol (travail réduit vs. labour) et la gestion des résidus de culture (restitution vs. exportation).

L'arrêt ou la réduction du travail du sol étant reconnu pour aboutir à la création d'une hétérogénéité verticale des couches de sol en comparaison du labour (Babujia et al., 2010; Holland & Coleman, 1987; Pascault et al., 2010; Purakayastha et al., 2009), l'échantillonnage réalisé en 2014 était stratifié avec la prise en compte de 2 horizons : 0-5 cm (20 échantillons, un par parcelle) et 5-20 cm (20 échantillons). Cette stratification était destinée à capter l'importance de ce gradient vertical pouvant contribuer à expliquer la différenciation entre les traitements après 4 ans. Dans chacun des 2 horizons et pour chaque traitement, les communautés de bactéries et de champignons ont été caractérisées en termes d'abondance (biomasse moléculaire microbienne), de diversité (indice de richesse), de structure et de composition taxonomique.

3.2.1. Biomasse moléculaire microbienne et diversité des bactéries et des champignons

Les valeurs moyennes de biomasse des quatre répétitions de parcelle obtenues pour chaque traitement ont été présentées dans le Tableau IV.5. La biomasse moléculaire microbienne des 40 échantillons de sol prélevés en 2014 variait entre 27 et 58 μg d'ADN/g sol. Quel que soit le traitement ou l'horizon de sol étudié, aucune différence de biomasse microbienne n'est apparue significative, ce qui indique qu'après 4 années, la biomasse microbienne reste globalement stable en dépit des différences de pratiques entre les 5 traitements. Toutefois, les valeurs de biomasse des traitements T2, T3 (présentant un travail réduit du sol) et T6 (culture pérenne) tendent à être supérieures aux valeurs des traitements T1 et T4 présentant un travail du sol important (labour). Pour les traitements T2 et T3, cette tendance à l'augmentation est plus marquée dans l'horizon le plus superficiel (0-5 cm). Ceci est en accord avec les données de la littérature qui rapportent de telles augmentations liées principalement à une accumulation de matière organique en surface (Sun et al., 2011; van Groenigen et al., 2010; Vian et al., 2009). Pour le traitement T6, cette tendance est observée dans les deux horizons. Dans ce traitement, la stimulation de biomasse microbienne dans les deux horizons pourrait être expliquée par l'arrêt total du travail du sol et par la présence de Switchgrass, plante pérenne qui contribue à la croissance microbienne *via* l'exsudation racinaire et l'apport de litière (racines et partie aériennes sénescentes) (Alvarez et al., 2000; Babujia et al., 2010; Sun et al., 2011; Vian et al., 2009).

Traitements	Horizons	Biomasse moléculaire microbienne ($\mu\text{g ADN/g sol}$)	Richesse des bactéries (nombre d'OTUs)	Richesse des champignons (nombre d'OTUs)
T1	0-5 cm	35,3 $\pm$ 4,6	1094 $\pm$ 33	494 $\pm$ 35
	5-20 cm	36,7 $\pm$ 4,5	963 $\pm$ 183	491 $\pm$ 67
T2	0-5 cm	45,6 $\pm$ 8,6	1086 $\pm$ 63	454 $\pm$ 92
	5-20 cm	37,8 $\pm$ 2,7	1129 $\pm$ 53	487 $\pm$ 19
T3	0-5 cm	45,9 $\pm$ 9,6	1127 $\pm$ 103	493 $\pm$ 32
	5-20 cm	40,7 $\pm$ 5,8	1079 $\pm$ 87	468 $\pm$ 27
T4	0-5 cm	33,7 $\pm$ 4,0	989 $\pm$ 26	550 $\pm$ 26
	5-20 cm	33,8 $\pm$ 1,4	882 $\pm$ 150	534 $\pm$ 62
T6	0-5 cm	39,4 $\pm$ 3,5	1063 $\pm$ 15	480 $\pm$ 16
	5-20 cm	40,9 $\pm$ 10,2	978 $\pm$ 158	472 $\pm$ 67

Tableau IV.5. Valeurs de biomasse moléculaire microbienne et de l'indice de richesse obtenues en 2014 après quatre ans de différenciation des traitements agricoles. T1 (labour/restitution des résidus), T2 (travail réduit/restitution des résidus), T3 (travail réduit/exportation des résidus), T4 (labour/restitution des résidus, faible apport azoté), T6 (culture pérenne de Switchgrass). L'analyse des variances a été effectuée par des ANOVA et aucune différence n'est apparue significative entre les communautés des différents traitements.

Comme présenté précédemment pour la biomasse, après quatre années de différenciation des traitements, aucune différence de richesse n'est apparue significative aussi bien pour les bactéries que pour les champignons, quel que soit l'horizon de sol. Les cinq traitements ne semblent donc pas avoir eu d'impact sur la diversité des bactéries et des champignons alors que plusieurs travaux ont rapporté que le labour peut avoir un effet négatif sur la diversité microbienne du sol, et en particulier sur les communautés de champignons en raison notamment de la rupture des hyphes mycéliens (Lienhard et al., 2014; Turbé et al., 2010; Verbruggen et al., 2010; Wright et al., 2005). Lienhard et al. (2013) et Kushwaha et al. (2001) ont par exemple montré que la biomasse et la diversité des communautés microbiennes étaient modifiées rapidement (< 3 années) suite à des modifications des pratiques dans des agro-écosystèmes tropicaux (travail du sol notamment). L'ensemble de ces résultats suggère donc que le temps nécessaire pour la différenciation de systèmes agricoles sur la base de ces indicateurs est plus long sous des climats tempérés comme celui caractérisant notre site, que dans des systèmes tropicaux. Il est intéressant de mentionner ici que les autres indicateurs mobilisés sur ce site dans le cadre du projet SOFIA, basés sur l'étude de la macrofaune, de la mésofaune et de la nématofaune montrent également une très faible différenciation des traitements (résultats non montrés), ce qui renforce cette hypothèse.

3.2.2. Structure et composition taxonomique des communautés bactériennes

Contrairement aux résultats obtenus pour la biomasse moléculaire microbienne et les indices de diversité, la structures des communautés bactériennes est significativement différente entre les traitements (Anosim = 0,001). En effet, sur le plan factoriel les

communautés bactériennes sont différenciées sur l'axe 2. Plus précisément, les traitements incluant un labour (T1 et T4) sont très discriminés du traitement T6 (culture pérenne sans labour), avec les deux traitements incluant un travail superficiel du sol (T2 et T3) se positionnant entre ces deux extrêmes. Ces résultats montrent donc qu'après 4 années, l'arrêt (T6) ou la réduction (T2 et T3) du travail du sol entraînent une modification de la structure des communautés bactériennes du sol. Au-delà du travail du sol, la plus forte différenciation observée pour le traitement T6 peut également être attribuée à la présence du couvert pérenne connu pour induire de profondes modifications de la diversité des communautés *via* la libération d'exsudats au niveau des racines et l'apport de litière (Hallmann et al., 1997; Mao et al., 2013; Técher et al., 2011).

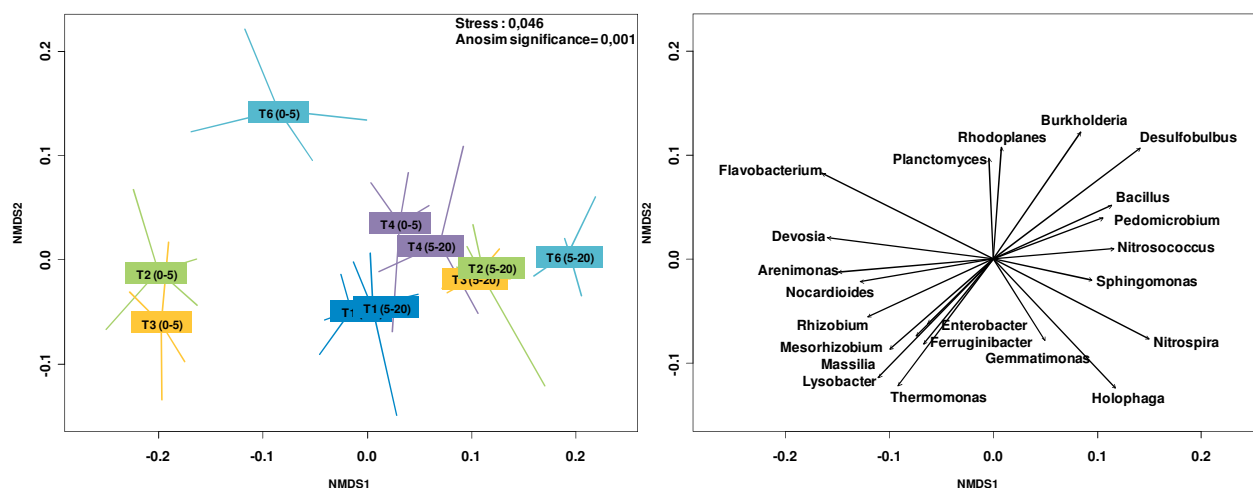


Figure IV.5. Analyses multidimensionnelles non-métriques (NMDS) des communautés bactériennes en 2014 après quatre ans de différenciation des cinq traitements pour les horizons de sol 0-5 et 5-20 cm. T1 (labour/restitution des résidus), T2 (travail réduit/restitution des résidus), T3 (travail réduit/exportation des résidus), T4 (labour/restitution des résidus, faible apport azoté), T6 (culture pérenne de Switchgrass), et genres discriminant les communautés bactériennes ($p < 0,05$).

Cette influence directe du couvert de switchgrass est confirmée par l'analyse de la composition taxonomique des communautés bactériennes qui montre que la discrimination du traitement T6 est due à la stimulation des genres *Rhodoplanes*, *Pedomicrobium*, *Hyphomicrobium* et *Burkholderia* qui sont décrits dans la littérature pour se développer en interaction avec les plantes dans la rhizosphère et pour inclure notamment des populations PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Kaymak, 2011; Mehnaz & Lazarovits, 2006; Rodríguez & Fraga, 1999) (Figure IV.5). La stimulation de ces groupes bactériens par la culture pérenne est en accord avec plusieurs travaux de la littérature (Bourgeois et al., 2015; Hallmann et al., 1997; Mao et al., 2013). Elle suggère que l'arrêt du travail du sol et/ou la

présence d'un couvert permanent entraîne une augmentation des interactions biotiques *via* la stimulation de populations bactériennes établissant des interactions étroites avec la plante.

Les communautés des traitements T2 et T3 (travail superficiel) sont différenciées de la culture pérenne (T6) et des traitements avec labour (T1 et T4) mais sont regroupés entre eux. La gestion des résidus (restitution *vs.* exportation) semble donc moins impacter les communautés que le travail du sol. Les communautés sous travail réduit sont également discriminées par la présence plus importante de groupes bactériens connus pour se développer et interagir avec les plantes au niveau de la rhizosphère tels que *Mesorhizobium*, *Flavobacterium*, *Devosia* et *Enterobacter* (Lodewyckx et al., 2002; Rodríguez & Fraga, 1999). Plus que la réduction du travail du sol, la stimulation de ces bactéries dans ces traitements pourrait être due à la présence de la culture intermédiaire d'avoine sur les sols au moment de l'échantillonnage. Les communautés des traitements T1 et T4 (labour et restitution des résidus) sont regroupées entre elles et sont donc très similaires. En comparaison de l'effet du labour, la fertilisation azotée, diminuée de moitié dans le traitement T4, ne semble donc pas impacter les communautés bactériennes.

Au-delà de la différenciation des traitements discutée dans le paragraphe précédent, l'analyse de la structure des communautés bactériennes dans les deux horizons échantillonnés (0-5 cm et 5-20 cm) montre que la réduction ainsi que l'arrêt du travail du sol induisent la création d'une différenciation verticale des communautés (Figure IV.5). En effet, aucune différenciation des deux horizons n'est observée dans les traitements T1 et T4, ce qui est cohérent avec les données de la littérature qui montrent que le labour entraîne une homogénéisation des propriétés physicochimiques et biologiques du sol dans la couche 0-20 cm (Aslam et al., 1999; Balota et al., 2004; Salinas-García et al., 2002; Wang et al., 2008). En revanche, dans les deux traitements incluant une réduction du travail du sol (T2 et T3), une discrimination très nette des deux horizons est observée sur le plan. Cette discrimination est expliquée principalement par la stimulation des genres *Rhizobium*, *Lysobacter*, *Devosia* et *Flavobacterium* dans l'horizon 0-5 cm, et par les genres *Nitrosococcus* et *Nitrospira* dans l'horizon 5-20 cm. Le genre *Lysobacter* est connu pour posséder des capacités lytiques poussées permettant à ses représentants de dégrader différentes macromolécules (Postma et al., 2011). La stimulation de ce groupe dans l'horizon superficiel pourrait donc s'expliquer par une augmentation de la teneur en carbone en surface généralement observée suite à la réduction du travail du sol. Les genres *Rhizobium*, *Flavobacterium* et *Devosia* sont quant à eux connus pour se développer en interaction étroite avec les racines des plantes (Lodewyckx

et al., 2002). Leur stimulation pourrait être due à l'inter-culture d'avoine présente sur la parcelle au moment du prélèvement. Par comparaison avec l'horizon 0-5 cm, la stimulation des genres *Nitrosococcus* et *Nitrospira* dans l'horizon 5-20 cm est cohérente avec les attributs oligotrophiques de ces populations qui sont caractérisées par des taux de croissance très faibles (Koops & Pommerening-Röser, 2001; Tardy et al., 2015). Elle suggère également une stimulation de la nitrification dans cet horizon puisque ces deux populations sont responsables respectivement de la nitrification et de la nitrification qui aboutissent à la formation de nitrate au cours de la nitrification (Jones et al., 2011; Juretschko et al., 1998).

Comme observé suite à la réduction du travail du sol, l'arrêt du travail du sol dans le traitement T6 a également induit une différenciation des communautés avec la profondeur. Cette différenciation pourrait être expliquée par les importantes quantités de substrats de différentes qualités fournies par le switchgrass pour les microorganismes telluriques au niveau de la surface du sol (développement d'une couche de litière organique), et dans le sol au niveau des racines par la production d'exsudats racinaires ou encore par les racines en décomposition.

3.2.3. Structure et composition taxonomique des communautés de champignons

L'analyse de la structure des communautés de champignons montre une discrimination significative entre les traitements (Anosim = 0,001). Comme observé pour les bactéries, le traitement T6 est le plus différencié par rapport aux traitements incluant un labour (T1 et T4), et les traitements incluant une réduction du travail du sol se positionnent en situation intermédiaire. Ces résultats montrent que la présence d'une culture pérenne (T6) induit une modification importante des communautés par rapport aux traitements avec culture annuelle, et que cette discrimination augmente avec la réduction du travail du sol. L'analyse de la composition taxonomique des communautés montre que la différenciation de T6 s'explique par la stimulation de genres particuliers de champignons tels que *Capronia*, *Endogone* ou encore *Diversispora* (Figure IV.6). Ces champignons sont connus pour se développer en étroite relation avec la plante puisque le genre *Capronia* contient des champignons mycorhiziens à éricoïdes (Allen et al., 2003), *Endogone* des champignons ectomycorhiziens (Ohtaka & Narisawa, 2008) et *Diversispora* des champignons mycorhiziens à arbuscules (Walker et al., 2007). Une stimulation du phylum *Basidiomycota* est également observée (données, non montrées). Ce phylum est décrit dans la littérature comme se développant principalement dans des milieux « tamponnés » comme les forêts et les prairies et pour

présenter des capacité métaboliques leur permettant de décomposer des substrats organiques complexes (Buée et al., 2009; Tardy et al., 2015).

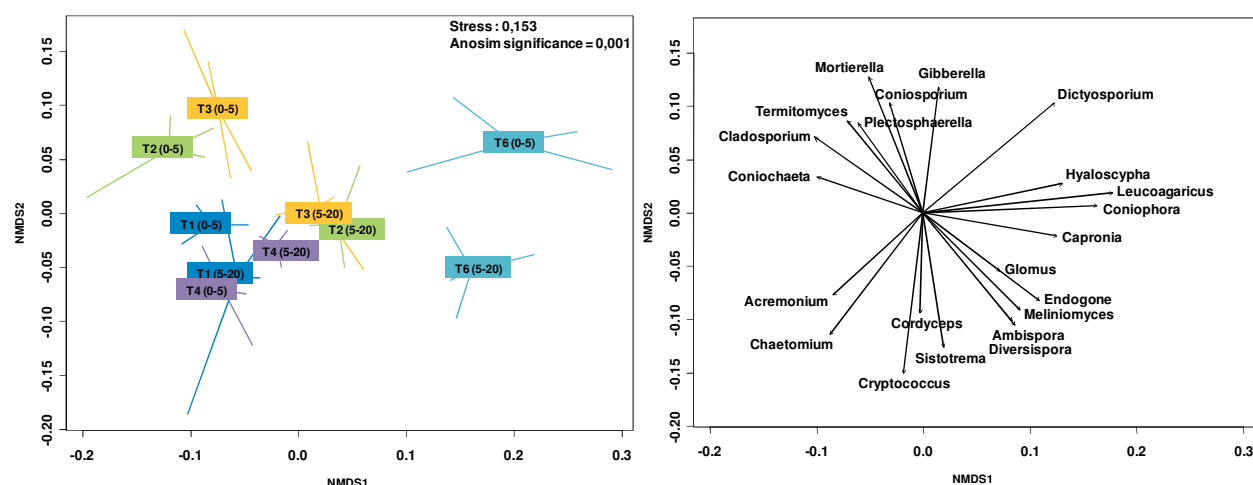


Figure IV.6. Analyses multidimensionnelles non-métriques (NMDS) des communautés de champignons en 2014 après quatre ans de différenciation des cinq traitements pour les horizons de sol 0-5 et 5-20 cm. T1 (labour/restitution des résidus), T2 (travail réduit/restitution des résidus), T3 (travail réduit/exportation des résidus), T4 (labour/restitution des résidus, faible apport azoté), T6 (culture pérenne de Switchgrass), genres discriminant les communautés de champignons ($p < 0,05$).

L'ensemble de ces résultats suggère donc que la différenciation du traitement T6 est probablement due à la sélection par la plante pérenne de groupes d'organismes symbiotiques, mais aussi à l'arrêt du travail du sol qui évite la rupture physique des hyphes mycéliens et qui préserve l'habitat microbien (Bourgeois et al., 2015; Lienhard et al., 2014; Verbruggen et al., 2010). La présence de Switchgrass permet donc l'établissement d'un environnement plus stable alimenté avec de la matière organique fraîche en surface (couche de litière végétale) et en profondeur avec le développement du réseau racinaire et la libération d'exsudats racinaires (Garbeva et al., 2004; Kowalchuk et al., 2002; Liang et al., 2012; Wardle et al., 2004; Yarwood et al., 2009).

Comme observé pour les communautés bactériennes, les traitements T1 et T4 sont différenciés des traitements T2 et T3. Ces résultats montrent qu'après 4 années, la réduction du travail du sol entraîne une modification de la structure des communautés de champignons. Ceci peut probablement s'expliquer par la préservation de l'habitat microbien et des hyphes mycéliens, comme évoqué précédemment pour le traitement T6. Dans notre étude, il est intéressant de noter que cette différenciation des communautés ne semble pas être modulée par la gestion des intrants organiques puisque les traitements T2 et T3 ne sont pas discriminés.

De même, la réduction de la fertilisation azotée ne semble pas moduler l'effet structurant du labour puisque les traitements T1 et T4 ne sont pas discriminés sur le plan factoriel.

Pour chaque traitement, la comparaison de la structure des communautés de champignons entre les deux horizons (0-5 cm et 5-20 cm) montre que dans les traitements incluant un labour (T1 et T4) les communautés sont similaires sur l'ensemble de la couche 0-20 cm alors qu'une différenciation verticale des communautés s'établit dans les traitements T2 et T3 (travail réduit), ainsi que dans le traitement T6. Ces résultats sont en accord avec ceux observés sur les communautés bactériennes et confirment que le labour a un effet très structurant sur les microorganismes du sol, qui se matérialise par une homogénéisation de la structure des communautés sur l'ensemble de l'horizon 0-20 cm (*i.e* la couche de labour). La discrimination des deux horizons observée dans les traitements T2 et T3 montre en revanche qu'après 4 années, la réduction du travail du sol permet une différenciation de la structure des communautés avec la profondeur. Il est intéressant de noter que la différenciation des communautés par rapport aux traitements T1 et T4 (labour) est plus marquée dans l'horizon superficiel que dans l'horizon profond. Ceci suggère que la couche 0-5 cm est la plus réactive, probablement en raison d'un enrichissement en substrats organiques en surface généralement observé dans les systèmes sous travail réduit (Sun et al., 2011; van Groenigen et al., 2010; Vian et al., 2009). Cette hypothèse est en accord avec les attributs écologiques des groupes microbiens stimulés dans cet horizon, et notamment les genres *Mortierella*, *Plectosphaerella*, *Coniochaeta* et *Myrothecium*, *Cladosporium* qui sont décrits comme des organismes copiotrophes (Baldrian et al., 2011; Ferrocino et al., 2013; Fumi et al., 2014; Ravindran et al., 2012).

Dans le traitement T6, les deux horizons sont également différenciés. Au-delà de l'arrêt du travail du sol dans ce traitement, cette différenciation verticale de la structure des communautés peut s'expliquer par la culture pérenne de Switchgrass. En effet, dans l'horizon 5-20 cm la stimulation des genres mycorhiziens *Endogone*, *Meliniomyces*, *Diversispora* et *Ambispora* (Allen et al., 2003; Amprayn et al., 2012; Liu et al., 2015; Ohtaka & Narisawa, 2008; Walker et al., 2007) indique qu'après 4 années la présence de la plante a entraîné la sélection de groupes microbiens particuliers, reconnus pour se développer en association étroite avec les racines des plantes dont elles vont augmenter la productivité *via* l'amélioration de l'absorption d'azote et de phosphore (Abbott & Robson, 1984; George et al., 1992), et la protection contre des microorganismes pathogènes (Linderman & Hendrix, 1982). Cette différenciation pourrait être expliquée par les importantes quantités de substrats

de différentes qualités fournies par le Switchgrass pour les microorganismes telluriques au niveau de la surface du sol (développement d'une couche de litière organique), et dans le sol au niveau des racines par la production d'exsudats racinaires ou encore par les racines en décomposition. Dans l'horizon superficiel 0-5 cm, la stimulation des genres *Dictyosporium* et *Hyaloscypha* suggère en revanche que la différenciation des communautés pourrait être expliquée par l'accumulation de la litière de Switchgrass en surface. En effet, ces champignons sont décrits dans la littérature comme des lignivores, vivants sur du bois mort et des feuilles en décomposition (Goh et al., 1999; Han et al., 2014).

4. Conclusion

Cette étude a eu pour objectifs de mesurer, à court terme, l'impact de cinq traitements agricoles sur les communautés de bactéries et de champignons des sols en termes d'abondance et de diversité taxonomique dans le but mesurer la viabilité de nouveaux agrosystèmes pour la production alimentaire et énergétique tout en préservant et utilisant durablement la biodiversité des sols. Après quatre années de discrimination des traitements agricoles, les communautés sous culture pérenne de Switchgrass ont été discriminées des communautés des traitements avec cultures annuelles par des microorganismes connus pour vivre en relation étroite avec la plante (champignons mycorhiziens, bactéries PGPR). Les communautés sous travail réduit étaient majoritairement composées de populations vivant en relation étroite avec la plante mais aussi copiotrophes et capables de se développer rapidement en présence de forte quantité de matière organique facilement dégradable et utilisable (Fontaine et al., 2004; Fontaine et al., 2003; Schimel, 2003).

Dans un contexte de mise en place de nouveaux agrosystèmes permettant d'obtenir une bonne productivité par parcelle tout en maintenant une biodiversité importante, les quatre traitements avec culture annuelle de ce site d'étude semblent applicables à grande échelle car malgré la différenciation des communautés microbiennes, les sols présentent toujours d'importantes biomasse et richesse et les microorganismes retrouvés majoritairement sont liés au recyclage des éléments minéraux nécessaire à la croissance des plantes et à la production végétale. La plantation de Switchgrass, quant à elle, semble être une pratique innovante efficace puisqu'elle permet le développement d'interactions biotiques entre les microorganismes et la plante, et permet également un approvisionnement en ressources lignocellulosiques disponibles pour les carburants de seconde génération.

5. Références bibliographiques

- Abbott, L. K., & Robson, A. D. (1984). The effect of VA mycorrhizae on plant growth.
- Adler, P. R., Sanderson, M. A., Boateng, A. A., Weimer, P. J., & Jung, H.-J. G. (2006). Biomass Yield and Biofuel Quality of Switchgrass Harvested in Fall or Spring. *Agronomy Journal*, 98(6), 1518. <http://doi.org/10.2134/agronj2005.0351>
- Allen, M. F., Swenson, W., Querejeta, J. I., Egerton-Warburton, L. M., & Treseder, K. K. (2003). Ecology of Mycorrhizae : A Conceptual Framework for Complex Interactions Among Plants and Fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 41(1), 271–303. <http://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095518>
- Allen, T. R., Millar, T., Berch, S. M., & Berbee, M. L. (2003). Culturing and direct DNA extraction find different fungi from the same ericoid mycorrhizal roots. *New Phytologist*, 160(1), 255–272. <http://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00885.x>
- Altieri, M. A. (1999). The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 74(1-3), 19–31. [http://doi.org/10.1016/S0167-8809\(99\)00028-6](http://doi.org/10.1016/S0167-8809(99)00028-6)
- Alvarez, C. R., Alvarez, R., Rosa, C., & Roberto, A. (2000). Short-term effects of tillage systems on active soil microbial biomass. *Biology and Fertility of Soils*, 31(2), 157–161. <http://doi.org/10.1007/s003740050639>
- Amprayn, K., Rose, M. T., Kecskés, M., Pereg, L., Nguyen, H. T., & Kennedy, I. R. (2012). Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth. *Applied Soil Ecology*, 61, 295–299. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.11.009>
- Ashraf, M., Hasnain, S., & Berge, O. (2013). Bacterial Exo-Polysaccharides: A Biological Tool for the Reclamation of Salt-Affected Soils. In *Developments in Soil Salinity Assessment and Reclamation*, 641–658.
- Aslam, T., Choudhary, M. A., & Saggarr, S. (1999). Tillage impacts on soil microbial biomass C, N and P, earthworms and agronomy after two years of cropping following permanent pasture in New Zealand. *Soil and Tillage Research*, 51(1–2), 103–111. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0167-1987\(99\)00032-X](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0167-1987(99)00032-X)
- Babujia, L. C., Hungria, M., Franchini, J. C., & Brookes, P. C. (2010). Microbial biomass and activity at various soil depths in a Brazilian oxisol after two decades of no-tillage and conventional tillage. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(12), 2174–2181. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.08.013>
- Baldrian, P., Voříšková, J., Dobiášová, P., Merhautová, V., Lisá, L., & Valášková, V. (2011). Production of extracellular enzymes and degradation of biopolymers by saprotrophic microfungi from the upper layers of forest soil. *Plant and Soil*, 338, 111–125. <http://doi.org/10.1007/s11104-010-0324-3>
- Balota, E. L., Colozzi Filho, A., Andrade, D. S., & Dick, R. P. (2004). Long-term tillage and crop rotation effects on microbial biomass and C and N mineralization in a Brazilian Oxisol. *Soil and Tillage Research*, 77(2), 137–145. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.still.2003.12.003>
- Barrios, E. (2007). Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecological Economics*, 64(2), 269–285. <http://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2007.03.004>
- Berner, A., Hildermann, I., Fliesbach, A., Pfiffner, L., Niggli, U., & Mader, P. (2008). Crop yield and soil fertility response to reduced tillage under organic management. *Soil and Tillage Research*, 101(1-2), 89–96. <http://doi.org/10.1016/j.still.2008.07.012>
- Bonnefond, P. (1970). L'introduction de la motorisation en agriculture traditionnelle, VII(4).
- Bourgeois, E., Dequiedt, S., Lelièvre, M., van Oort, F., Lamy, I., Maron, P.-A., & Ranjard, L. (2015). Positive effect of the *Miscanthus* bioenergy crop on microbial diversity in wastewater-contaminated soil. *Environmental Chemistry Letters*. <http://doi.org/10.1007/s10311-015-0531-5>

- Bourgeois, E., Dequiedt, S., Lelièvre, M., van Oort, F., Lamy, I., Ranjard, L., & Maron, P. A. (2015). Miscanthus bioenergy crop stimulates nutrient-cycler bacteria and fungi in wastewater-contaminated agricultural soil. *Environmental Chemistry Letters*. <http://doi.org/10.1007/s10311-015-0532-4>
- Buée, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R. H., Uroz, S., & Martin, F. (2009). 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist*, 184(2), 449–456. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03003.x>
- Butchart S. H. M., Walpole M., Collen B., van Strien A., Scharlemann J. P. W., Almond R. E. A., Bomhard B., Brown C., Bruno J., Carpenter K. E., Carr G.M., Chanson J., Chenery A. M., Csirke J., Davidson N.C., Dentener F., Foster M., Galli A., Galloway J. , W. R. (2010). Global Biodiversity : Indicators of, (May), 1164–1169. <http://doi.org/10.1126/science.1187512>
- Constancias, F., Prévost-Bouré, N. C., Terrat, S., Aussems, S., Nowak, V., Guillemin, J.-P., ... Ranjard, L. (2014). Microscale evidence for a high decrease of soil bacterial density and diversity by cropping. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(4), 831–840. <http://doi.org/10.1007/s13593-013-0204-3>
- Constancias, F., Terrat, S., Saby, N. P. A., Horrigue, W., Villerd, J., Guillemin, J.-P., ... Chemidlin Prévost-Bouré, N. (2015). Mapping and determinism of soil microbial community distribution across an agricultural landscape. *MicrobiologyOpen*, 4(3), 505–517. <http://doi.org/10.1002/mbo3.255>
- Curtis, T. P., & Sloan, W. T. (2005). Exploring Microbial Diversity— A Vast Below. *Science*, 39(1998), 2004–2006. <http://doi.org/10.1126/science.1118176>
- Dequiedt, S., Saby, N. P. A., Lelievre, M., Jolivet, C., Thioulouse, J., Toutain, B., ... Ranjard, L. (2011). Biogeographical patterns of soil molecular microbial biomass as influenced by soil characteristics and management. *Global Ecology and Biogeography*, 20(4), 641–652. <http://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2010.00628.x>
- Duraiappah, A. K., Naeem, S., Agardy, T., Ash, N. J., Cooper, H. D., Díaz, S., ... Jaarsve, A. Van. (2005). Ecosystems and human well-being. *Ecosystems*, 5(281), 1–100. <http://doi.org/10.1196/annals.1439.003>
- Ferrocino, I., Pugliese, M., Gilardi, G., Gullino, M. L., & Garibaldi, A. (2013). Analysis by PCR-DGGE of microflora in soil treated with different ammendments. *Protezione Delle Colture*, 2, 67–68.
- Foley, J. a, Defries, R., Asner, G. P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S. R., ... Snyder, P. K. (2005). Global consequences of land use. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5734), 570–4. <http://doi.org/10.1126/science.1111772>
- Fontaine, S., Bardoux, G., Abbadie, L., & Mariotti, A. (2004). Carbon input to soil may decrease soil carbon content. *Ecology Letters*, 7(4), 314–320. <http://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00579.x>
- Fontaine, S., Mariotti, A., & Abbadie, L. (2003). The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biology and Biochemistry*, 35(6), 837–843. [http://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00123-8](http://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00123-8)
- Fumi, M. D., Mazzoleni, V., Novelli, E., Galli, R., Busconi, M., Blaghen, M., ... Mclellan, I. (2014). Pedologic characteristics and fungi community in unmanaged cork oak forest soil of two Mediterranean regions : Sardinia and Tunisia, 101, 31–38.
- Garbeva, P., van Veen, J. A., & van Elsas, J. D. (2004). MICROBIAL DIVERSITY IN SOIL: Selection of Microbial Populations by Plant and Soil Type and Implications for Disease Suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, 42(1), 243–270. <http://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.012604.135455>
- George, E., Häussler, K. U., Vetterlein, D., Gorgus, E., & Marschner, H. (1992). Water and nutrient translocation by hyphae of *Glomus mosseae*. *Canadian Journal of Botany*, 70(11), 2130–2137.
- Gobat, J. M., Aragno, M., & Matthey, W. (2010). *Le sol vivant: bases de pédologie, biologie des sols*.

- Goh, T., Hyde, K. D., & Ho, W. H. (1999). A revision of the genus *Dictyosporium*, three new species with descriptions of. *Fungal Diversity*, 2(March), 65–100.
- Hallin, S., Jones, C. M., Schlöter, M., & Philippot, L. (2009). Relationship between N-cycling communities and ecosystem functioning in a 50-year-old fertilization experiment. *The ISME Journal*, 3(5), 597–605.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, a., Mahaffee, W. F., & Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(10), 895–914. <http://doi.org/10.1139/m97-131>
- Han, J.-G., Hosoya, T., Sung, G.-H., & Shin, H.-D. (2014). Phylogenetic reassessment of Hyaloscyphaceae sensu lato (Helotiales, Leotiomycetes) based on multigene analyses. *Fungal Biology*, 118(2), 150–167. <http://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.11.004>
- Helgason, T., Daniell, T. J., Husband, R., Fitter, a H., & Young, J. P. (1998). Ploughing up the wood-wide web? *Nature*, 394(6692), 431. <http://doi.org/10.1038/28764>
- Holland, J. M. (2004). The environmental consequences of adopting conservation tillage in Europe: Reviewing the evidence. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 103(1), 1–25. <http://doi.org/10.1016/j.agee.2003.12.018>
- Holland, E. A., & Coleman, D. C. (1987). Litter placement effects on microbial and organic matter dynamics in an agroecosystem. *Ecology*, 425–433.
- Jones, M. D. M., Richards, T. A., Hawksworth, D. L., & Bass, D. (n.d.). Validation and justification of the phylum name *Cryptomycota* phyl. nov. *IMA Fungus*. Retrieved from <http://www.ingentaconnect.com/content/ima/imafung/2011/00000002/00000002/art00015>
- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M. C., Schleifer, K.-H., Pommerening-Röser, A., Koops, H.-P., & Wagner, M. (1998). Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(8), 3042–3051.
- Kaymak, H. C. (2011). Potential of PGPR in agricultural innovations. *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*, 45–79.
- Koops, H. P., & Pommerening-Röser, A. (2001). Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiology Ecology*, 37(1), 1–9. [http://doi.org/10.1016/S0168-6496\(01\)00137-4](http://doi.org/10.1016/S0168-6496(01)00137-4)
- Kowalchuk, G. A., Buma, D. S., de Boer, W., Klinkhamer, P. G. L., & van Veen, J. A. (2002). Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *International Journal of General and Molecular Microbiology*, 81, 509–520. <http://doi.org/10.1023/A:1020565523615>
- Kushwaha, C. P., Tripathi, S. K., & Singh, K. P. (2000). Variations in soil microbial biomass and N availability due to residue and tillage management in a dryland rice agroecosystem. *Soil and Tillage Research*, 56(3–4), 153–166. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0167-1987\(00\)00135-5](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0167-1987(00)00135-5)
- Kushwaha, C. P., Tripathi, S. K., & Singh, K. P. (2001). Soil organic matter and water-stable aggregates under different tillage and residue conditions in a tropical dryland agroecosystem. *Applied Soil Ecology*, 16, 229–241. [http://doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00121-9](http://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00121-9)
- Lal, R., & Kimble, J. M. (1997). Conservation tillage for carbon sequestration. *Nutrient Cycling in Agroecosystem*, 49, 243–253. <http://doi.org/Doi 10.1023/A:1009794514742>
- Liang, C., Jesus, E. da C., Duncan, D. S., Jackson, R. D., Tiedje, J. M., & Balser, T. C. (2012). Soil microbial communities under model biofuel cropping systems in southern Wisconsin, USA: Impact of crop species and soil properties. *Applied Soil Ecology*, 54, 24–31. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.11.015>

- Lienhard, P., Terrat, S., Prévost-Bouré, N. C., Nowak, V., Régnier, T., Sayphoummie, S., ... Ranjard, L. (2014). Pyrosequencing evidences the impact of cropping on soil bacterial and fungal diversity in Laos tropical grassland. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(2), 525–533. <http://doi.org/10.1007/s13593-013-0162-9>
- Lienhard, P., Tivet, F., Chabanne, A., Dequiedt, S., Lelièvre, M., Sayphoummie, S., ... Ranjard, L. (2013). No-till and cover crops shift soil microbial abundance and diversity in Laos tropical grasslands. *Agronomy for Sustainable Development*, 33(2), 375–384. <http://doi.org/10.1007/s13593-012-0099-4>
- Linderman, R. G., & Hendrix, J. W. (1982). Evaluation of plant response to colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi.
- Liu, Y., Johnson, N. C., Mao, L., Shi, G., Jiang, S., Ma, X., ... Feng, H. (2015). Phylogenetic structure of arbuscular mycorrhizal community shifts in response to increasing soil fertility. *Soil Biology and Biochemistry*, 89, 196–205. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.07.007>
- Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E. R. B., Taghavi, S., Mezgeay, M., & der Lelie, D. van. (2002). Endophytic Bacteria and Their Potential Applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(6), 583–606. <http://doi.org/10.1080/0735-260291044377>
- Mao, Y., Yannarell, A. C., Davis, S. C., & Mackie, R. I. (2013). Impact of different bioenergy crops on N-cycling bacterial and archaeal communities in soil. *Environmental Microbiology*, 15(3), 928–942. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02844.x>
- Mehnaz, S., & Lazarovits, G. (2006). Inoculation Effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on Corn Plant Growth Under Greenhouse Conditions. *Microbial Ecology*, 51(3), 326–335. <http://doi.org/10.1007/s00248-006-9039-7>
- Mummey, D., Holben, W., Six, J., & Stahl, P. (2006). Spatial stratification of soil bacterial populations in aggregates of diverse soils. *Microbial Ecology*, 51(3), 404–411.
- Ohtaka, N., & Narisawa, K. (2008). Molecular characterization and endophytic nature of the root-associated fungus *Meliniomyces variabilis* (LtVB3). *Journal of General Plant Pathology*, 74(1), 24–31. <http://doi.org/10.1007/s10327-007-0046-4>
- Parrish, D. J., & Fike, J. H. (2005). The Biology and Agronomy of Switchgrass for Biofuels. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24(5-6), 423–459. <http://doi.org/10.1080/07352680500316433>
- Pascual, N., Cécillon, L., Mathieu, O., Hénault, C., Sarr, A., Lévêque, J., ... Maron, P.-A. (2010). In Situ Dynamics of Microbial Communities during Decomposition of Wheat, Rape, and Alfalfa Residues. *Microbial Ecology*, 60(4), 816–828. <http://doi.org/10.1007/s00248-010-9705-7>
- Paul, E. A. (2014). *Soil microbiology, ecology and biochemistry*.
- Postma, J., Schilder, M. T., & van Hoof, R. A. (2011). Indigenous Populations of Three Closely Related *Lysobacter* spp. in Agricultural Soils Using Real-Time PCR. *Microbial Ecology*, 62(4), 948–958. <http://doi.org/10.1007/s00248-011-9847-2>
- Purakayastha, T. J., Smith, J. L., & Huggins, D. R. (2009). Microbial biomass and N cycling under native prairie, conservation reserve and no-tillage in Palouse soils. *Geoderma*, 152(3–4), 283–289. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2009.06.013>
- Ravindran, A., Adav, S. S., & Sze, S. K. (2012). Characterization of extracellular lignocellulolytic enzymes of *Coniochaeta* sp. during corn stover bioconversion. *Process Biochemistry*, 47(12), 2440–2448. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.10.003>
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4-5), 319–339. [http://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](http://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2)

- Salinas-García, J. R., Velázquez-García, J. d. J., Gallardo-Valdez, M., Díaz-Mederos, P., Caballero-Hernández, F., Tapia-Vargas, L. M., & Rosales-Robles, E. (2002). Tillage effects on microbial biomass and nutrient distribution in soils under rain-fed corn production in central-western Mexico. *Soil and Tillage Research*, 66(2), 143–152. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0167-1987\(02\)00022-3](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0167-1987(02)00022-3)
- Schimel, J. (2003). The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil: a theoretical model. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(4), 549–563. [http://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00015-4](http://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00015-4)
- Sun, B., Hallett, P., Caul, S., Daniell, T., & Hopkins, D. (2011). Distribution of soil carbon and microbial biomass in arable soils under different tillage regimes. *Plant and Soil*, 338(1-2), 17–25. <http://doi.org/10.1007/s11104-010-0459-2>
- Tang, J., Mo, Y., Zhang, J., & Zhang, R. (2011). Influence of biological aggregating agents associated with microbial population on soil aggregate stability. *Applied Soil Ecology*, 47(3), 153–159. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.01.001>
- Tardy, V., Chabbi, A., Charrier, X., de Berranger, C., Reignier, T., Dequiedt, S., ... Maron, P.-A. (2015). Land Use History Shifts In Situ Fungal and Bacterial Successions following Wheat Straw Input into the Soil. *Plos One*, 10(6), e0130672. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0130672>
- Tebrügge, F., Düring, R. -a., Du, R., & Tebru, F. (1999). Reducing tillage intensity - A review of results from a long-term study in Germany. *Soil and Tillage Research*, 53(1), 15–28. [http://doi.org/10.1016/S0167-1987\(99\)00073-2](http://doi.org/10.1016/S0167-1987(99)00073-2)
- Técher, D., Laval-Gilly, P., Henry, S., Bennasroune, A., Formanek, P., Martinez-Chois, C., ... Falla, J. (2011). Contribution of Miscanthus x giganteus root exudates to the biostimulation of PAH degradation: An in vitro study. *Science of The Total Environment*, 409(20), 4489–4495. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.06.049>
- Terrat, S., Christen, R., Dequiedt, S., Lelièvre, M., Nowak, V., Regnier, T., ... Ranjard, L. (2012). Molecular biomass and MetaTaxogenomic assessment of soil microbial communities as influenced by soil DNA extraction procedure. *Microbial Biotechnology*, 5(1), 135–141. <http://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00307.x>
- Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R., & Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418(6898), 671–7. <http://doi.org/10.1038/nature01014>
- Torsvik, V., & Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5(3), 240–245. [http://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00324-7](http://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00324-7)
- Turbé, A., De Toni, A., Benito, P., Lavelle, P., Lavelle, P., Camacho, N. R., ... & Mudgal, S. (2010). Soil biodiversity: functions, threats and tools for policy makers.
- van Groenigen, K.-J., Bloem, J., Bååth, E., Boeckx, P., Rousk, J., Bodé, S., ... Jones, M. B. (2010). Abundance, production and stabilization of microbial biomass under conventional and reduced tillage. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(1), 48–55. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.09.023>
- Verbruggen, E., Rölting, W. F. M., Gamper, H. a., Kowalchuk, G. a., Verhoef, H. a., & van der Heijden, M. G. a. (2010). Positive effects of organic farming on below-ground mutualists: Large-scale comparison of mycorrhizal fungal communities in agricultural soils. *New Phytologist*, 186(4), 968–979. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03230.x>
- Vian, J. F., Peigne, J., Chaussod, R., & Roger-Estrade, J. (2009). Effects of four tillage systems on soil structure and soil microbial biomass in organic farming. *Soil Use and Management*, 25(1), 1–10. <http://doi.org/10.1111/j.1475-2743.2008.00176.x>

- Walker, C., Vestberg, M., Demircik, F., Stockinger, H., Saito, M., Sawaki, H., ... Schüßler, A. (2007). Molecular phylogeny and new taxa in the Archaeosporales (Glomeromycota): *Ambispora fennica* gen. sp. nov., *Ambisporaceae* fam. nov., and emendation of *Archaeospora* and *Archaeosporaceae*. *Mycological Research*, 111(2), 137–153. <http://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.11.008>
- Wang, Q., Bai, Y., Gao, H., He, J., Chen, H., Chesney, R. C., ... Li, H. (2008). Soil chemical properties and microbial biomass after 16 years of no-tillage farming on the Loess Plateau, China. *Geoderma*, 144(3–4), 502–508. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2008.01.003>
- Wardle, D. a, Bardgett, R. D., Klironomos, J. N., Setälä, H., van der Putten, W. H., & Wall, D. H. (2004). Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5677), 1629–1633. <http://doi.org/10.1126/science.1094875>
- Webster, R., & Oliver, M. A. (2010). *Geostatistics for environmental scientists*.
- Wright, A. L., Hons, F. M., & Matocha Jr., J. E. (2005). Tillage impacts on microbial biomass and soil carbon and nitrogen dynamics of corn and cotton rotations. *Applied Soil Ecology*, 29(1), 85–92. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2004.09.006>
- Yao, H., He, Z., Wilson, M., & Campbell, C. (2000). Microbial Biomass and Community Structure in a Sequence of Soils with Increasing Fertility and Changing Land Use. *Microbial Ecology*, 40(3), 223–237. <http://doi.org/10.1007/s002480000053>
- Yarwood, S. a., Myrold, D. D., & Högberg, M. N. (2009). Termination of belowground C allocation by trees alters soil fungal and bacterial communities in a boreal forest. *FEMS Microbiology Ecology*, 70(1), 151–162. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00733.x>
- http://www2.dijon.inra.fr/plateforme_genosol/plateforme-genosol
- <http://www6.lille.inra.fr/las>

Conclusion & Perspectives

1. Rappel des principaux objectifs de la thèse

Les communautés microbiennes jouent un rôle majeur dans le fonctionnement biologique du sol et sont sensibles à leurs changements de mode d'usage. De nombreux outils moléculaires ont été développés afin d'étudier les communautés *via* la caractérisation de leur ADN. Ils permettent notamment de déterminer l'abondance, la structure, les diversités taxonomique et fonctionnelle des communautés de bactéries et de champignons, qui sont des bioindicateurs de la qualité microbienne des sols. Il existe toutefois un manque de standardisation de ces bioindicateurs dont la robustesse et la sensibilité doivent être éprouvées dans un cadre standardisé, et qui doivent être appliqués dans des situations expérimentales aussi bien au laboratoire qu'au terrain.

Dans ce contexte, les objectifs principaux de cette thèse ont été :

- de standardiser deux bioindicateurs microbiens, la biomasse moléculaire microbienne et la diversité taxonomique des communautés de bactéries et de champignons, et de déterminer leur gamme de variation et leur sensibilité en situations expérimentales contrôlées,
- de tester au terrain la capacité de ces deux indicateurs à rendre compte de modifications des communautés de bactéries et de champignons en réponse à (i) la réhabilitation d'un sol pollué *via* une culture énergétique (*Miscanthus x giganteus*), et (ii) des modifications de pratiques agricoles (cultures pérenne ou annuelle/travail du sol/gestion des résidus de culture/fertilisation azotée).

2. Conclusion

2.1. Standardisation de deux bioindicateurs microbiens : la biomasse moléculaire microbienne et la diversité taxonomique des bactéries et des champignons

La variabilité méthodologique de deux bioindicateurs microbiens : la biomasse moléculaire et la diversité taxonomique microbiennes, a été de tester au laboratoire en conditions contrôlées. L'étude de la reproductibilité de la biomasse moléculaire microbienne a permis de mettre en évidence la variabilité technique de cet indicateur mais également de proposer des stratégies d'analyse, que ce soit au laboratoire ou au terrain (stratégie d'échantillonnage). De plus, les valeurs de biomasse mesurées étaient spécifiques à chaque sol, permettant de discriminer les sols de forêt, de culture ou encore de prairie. Nos résultats ont ainsi montré que ce bioindicateur est reproductible et sensible aux variations de mode d'usage des sols.

L'étude de la diversité taxonomique des communautés de bactéries et de champignons a permis de montrer l'importance de l'utilisation d'une seule procédure d'extraction d'ADN du sol standardisée dans un contexte d'écologie microbienne moderne où des études de métagénomique sont effectuées à grande échelle. En effet, nos résultats ont montré que l'image de la diversité microbienne obtenue par séquençage haut débit peut varier selon la procédure d'extraction d'ADN en termes de richesse mais aussi au niveau de la récupération de certaines populations. Toutefois, pour une procédure donnée, cette image est reproductible puisque les communautés microbiennes des différents sols sont bien discriminées entre elles (sensibilité aux variations de mode d'usage des sols) et les communautés sont bien spécifiques pour un même sol. Malgré toutes les étapes techniques pouvant mener à des biais, de l'extraction de l'ADN du sol à l'analyse bioinformatique des données de séquençage massif, la diversité taxonomique des communautés ressort donc comme un bioindicateur robuste et sensible aux variations de mode d'usage des sols.

Nos analyses, bien que prenant en compte la variabilité des modes d'usage du sol et leurs caractéristiques physico-chimiques reconnues pour influencer les communautés microbiennes telluriques (Dequiedt et al., 2011; Rousk et al., 2010; Griffiths & Philippot, 2013) ne se sont basées que sur un nombre limité de sol. La généralisation des résultats nécessiterait d'autres travaux prenant en compte de nombreux autres sols présentant des caractéristiques physico-chimiques variées afin d'affiner notre estimation de la variabilité technique et de la sensibilité des bioindicateurs.

Il serait également nécessaire d'étudier la variabilité de ces deux bioindicateurs microbiens dans d'autres laboratoires à partir des mêmes échantillons de sol afin de mettre en évidence leur reproductibilité à l'échelle aussi bien nationale qu'internationale. Cela permettrait d'envisager leur normalisation et de faciliter l'adoption d'une procédure unique au niveau international, ce qui améliorerait les comparaisons des résultats d'études effectuées dans ces différents laboratoires. Ces analyses ont été réalisées dans le cas de la norme ISO 11063 (Pétrie et al., 2011). Toutefois, l'amélioration perpétuelle des procédures d'extraction de l'ADN microbien du sol et de caractérisation des communautés aussi bien en termes d'abondance que de diversité (*i.e.* passage des techniques de séquençage massif telles que le pyroséquençage 454 à l'Illumina...) rend difficile la normalisation d'un bioindicateur afin de l'utiliser à grande échelle. Une procédure standardisée de caractérisation de la diversité des communautés devra donc être évolutive pour suivre les développements méthodologiques qui sont très rapides dans ce domaine.

2.2. Suivi par des bioindicateurs microbiens de la réhabilitation d'un sol pollué

Le déploiement sur le terrain des deux bioindicateurs (éprouvés techniquement dans le chapitre précédent) pour évaluer l'effet d'une culture pérenne à vocation énergétique (*Miscanthus x giganteus*) en termes de réhabilitation de l'état biologique d'un sol pollué a montré une réactivité différentielle des indicateurs dans ce contexte particulier. En effet, la plantation de *Miscanthus* n'a pas eu d'effet sur la biomasse moléculaire microbienne, alors qu'elle a induit des modifications importantes en termes de diversité des communautés de bactéries et de champignons (structure et composition taxonomique).

L'absence de réactivité de la biomasse moléculaire pourrait sembler étonnante puisque cet indicateur a déjà été démontré sensible aux variations de mode d'usage des sols dans d'autres études (Dequiedt et al., 2011; Lienhard et al., 2013; Fornasier et al., 2014). De plus, les biomasses microbiennes sous cultures pérennes sont généralement supérieures à celles sous cultures annuelles (Wardle et al., 1999; Haynes & Francis, 1993; DuPont et al., 2010). Le *Miscanthus x giganteus* nécessite environ 5 ans pour obtenir une bonne implantation sur des sols non contaminés (Lewandowski et al., 2003). Toutefois, dans le contexte particulier du site d'étude, le miscanthus n'est planté que depuis 4 ans au maximum et sur des sols pollués. Le temps après implantation de cette culture pérenne peut être trop court pour observer des effets bénéfiques sur la biomasse microbienne. De plus, cette absence de variation de biomasse pourrait s'expliquer par la pression effectuée par les pollutions multiples et le fort ratio C/N du sol, hérité de plus de 100 ans d'irrigation avec des eaux usées, et qui limitent la croissance microbienne.

La diversité taxonomique des bactéries et des champignons s'est révélée être un indicateur plus sensible dans le cadre de ce travail, avec une réactivité précoce des indices de richesse sous culture pérenne et une stimulation de populations particulières connues pour vivre en étroite relation avec la plante (formation de symbioses) et pour être impliquées dans le recyclage des nutriments du sol et notamment l'azote ce qui est d'une grande importance pour ces sols présentant un fort ratio C/N. La culture pérenne de *Miscanthus x giganteus*, déjà connue pour représenter une solution pour relancer le potentiel économique des sols pollués (Evangelou et al., 2012; Ollivier et al., 2012; Pavel et al., 2014; Price et al., 2004; Straub et al., 2013), apparaît donc également comme une pratique favorable à la réhabilitation des propriétés microbiologiques de ces sols à court terme.

Au-delà des sorties écologiques de ces travaux, les résultats montrent la complémentarité des indicateurs microbiens et la nécessité de baser le diagnostic sur une combinaison d'indicateurs et non sur un indicateur élémentaire.

2.3. Réponse des bioindicateurs aux changements du travail du sol et de la gestion des résidus de culture

Les deux bioindicateurs ont enfin été testés au terrain pour évaluer à court terme l'impact de différents traitements agricoles (culture pérenne de Switchgrass *vs.* cultures annuelles, travail du sol intensif *vs.* réduit, exportation *vs.* restitution des résidus de culture) sur les communautés microbiennes du sol. Nos résultats ont montré, comme lors de l'étude précédente, une réactivité différentielle des indicateurs. En effet, les différents traitements n'ont pas impacté significativement la biomasse moléculaire microbienne ni les indices de richesse des communautés de bactéries et de champignons, alors que la structure et la composition des communautés microbiennes ont été modifiées.

Comme discuté précédemment, l'absence de réactivité de la biomasse moléculaire microbienne aux différents traitements est étonnante puisque les traitements présentant une culture pérenne, un travail réduit ou un apport en nutriments par la restitution des résidus de culture sont connus pour augmenter la biomasse microbienne des sols (DuPont et al., 2010; Babujia et al., 2010; Purakayastha et al., 2009). L'absence de diminution de la richesse lors de l'intensification de l'utilisation des terres est également un résultat original de ce travail et pourrait s'expliquer par le fait que le temps nécessaire pour observer une différenciation des communautés sous différents systèmes agricoles est long sous des climats tempérés, sur la base de ces indicateurs.

La composition taxonomique des bactéries et des champignons s'est révélée être un bioindicateur sensible, avec une réactivité précoce des communautés en fonction de l'intensité du travail du sol (labour *vs.* travail réduit *vs.* non travail), marquée par la stimulation de populations particulières. Les attributs écologiques connus de ces populations suggèrent que la réduction du travail du sol et/ou la culture pérenne permettent une augmentation des interactions biotiques entre les communautés microbiennes et les plantes ainsi qu'une stimulation des cycles biogéochimiques (C et N). En comparaison du travail du sol, la gestion des résidus de culture (volume des résidus restitués) et la fertilisation azotée (diminution de moitié) ont eu peu d'influence sur les propriétés microbiologiques des sols.

Ces résultats illustrent qu'au sein d'un système agricole, certaines pratiques ont plus d'impact que d'autres sur les communautés microbiennes du sol.

2.4. Conclusion générale

Dans un contexte scientifique, nos résultats montrent que la biomasse moléculaire microbienne et la diversité taxonomique des communautés de bactéries et de champignons sont des bioindicateurs microbiens standardisés au laboratoire et dont les limites techniques ont pu être mises en évidence, permettant ainsi de minimiser la variabilité méthodologique et de prendre conscience des possibles biais existants. Ces résultats nous ont également permis de mettre au point des stratégies d'analyse que ce soit au laboratoire mais aussi au terrain. Ces bioindicateurs ont présenté des niveaux de réactivité différents, la diversité taxonomique des communautés de bactéries et de champignons étant plus précoce par rapport à la biomasse moléculaire microbienne. A court terme, la diversité taxonomique est apparue plus sensible que la biomasse microbienne à la mise au point de pratiques innovantes pour réutiliser des sols pollués et en réponse à des modifications du travail du sol et de la gestion des résidus de culture. Ces résultats ont montré la nécessité de baser nos conclusions à partir d'une combinaison de bioindicateurs. L'utilisation de ces outils permet donc d'identifier et de quantifier aussi bien les perturbations que les transformations des sols et les impacts en découlant sur les microorganismes, et par conséquent de suivre la durabilité des systèmes de production agricoles (Bispo *et al.*, 2009; Sparling *et al.*, 1997; Fierer & Ladau, 2012).

Dans un contexte plus agronomique, nos résultats ont permis de mettre en évidence que les pratiques agricoles passées (*e.g.* irrigation pendant une centaine d'années de parcelles agricoles avec des eaux usées) ou présentes (*e.g.* intensité de travail du sol) impactent la diversité microbienne de façons positives ou négatives. La gestion des sols agricoles par les agriculteurs peut donc influencer fortement les communautés microbiennes du sol et les services dans lesquels elles sont impliquées, impactant directement la productivité et la durabilité des agrosystèmes.

3. Perspectives

Les résultats de ce travail de thèse ont montré que la biomasse moléculaire microbienne et la diversité taxonomique des communautés de bactéries et de champignons sont deux bioindicateurs pertinents pour évaluer la qualité microbiologique des sols agricoles.

Toutefois, pour conforter la généricité de ces conclusions, d'autres travaux apparaissent nécessaires.

3.1. Affiner l'évaluation de la variabilité technique des indicateurs

L'étude de la reproductibilité des bioindicateurs a été effectuée sur un faible nombre de sols choisis comme références de par leur mode d'usage et leurs caractéristiques physico-chimiques variés. Il est cependant reconnu que les propriétés physico-chimiques des sols ont une influence importante sur la diversité et l'activité des communautés microbiennes du sol (Ranjard et al., 2010; Rousk et al., 2010). Dans ce contexte, une perspective de ces travaux serait d'examiner la reproductibilité des bioindicateurs en prenant en compte une large gamme de sols présentant des caractéristiques physico-chimiques et pédoclimatiques variées afin d'évaluer plus finement la variabilité de la biomasse moléculaire microbienne et de la diversité taxonomique des communautés de bactéries et de champignons.

La sensibilité des deux bioindicateurs a été mesurée dans deux contextes agronomiques particuliers, à l'échelle de la parcelle agricole, sur des sols présentant des caractéristiques physico-chimiques homogènes et non représentatives de l'hétérogénéité des sols retrouvés à l'échelle nationale. Leur sensibilité aux modifications de pratiques agricoles ou leur réponse en environnements pollués devraient être mesurée dans d'autres essais présentant des types de sol différents pour conforter la généricité des résultats. Pour cela, il pourrait être intéressant de mettre en place d'autres sites expérimentaux présentant les mêmes traitements agricoles, les mêmes cultures, les mêmes itinéraires techniques, pour pouvoir suivre l'impact des caractéristiques pédoclimatiques et physico-chimiques des sols sur les propriétés microbiologiques des sols. Afin d'étudier la réhabilitation des sols pollués par des cultures à vocation énergétique, il serait intéressant de créer des dispositifs expérimentaux sur des sols pollués présentant si possible des historiques de pollution différents et des gradients de contamination afin de voir comment les communautés microbiennes réagissent en situations contrastées.

3.2. Hiérarchiser l'impact des pratiques agricoles sur les bioindicateurs

Nos résultats ont montré que certaines pratiques impactent plus fortement que d'autres les communautés microbiennes du sol (*e.g.* le travail du sol impacte plus que la gestion des résidus de culture et la fertilisation azotée, Chapitre IV). Il serait maintenant intéressant de mettre au point des sites expérimentaux variant par l'intensité du travail du sol (travail

intensif/travail réduit/non travail), la rotation culturale (rotation/monoculture), la gestion des résidus de culture (restitution totale/partielle (50%)/exportation complète), la fertilisation (normale/réduite de 50%/absente), et la gestion des cultures intermédiaires (culture intermédiaire piège à nitrates/absence de culture intermédiaire) ; permettant d'établir une hiérarchie des pratiques selon leurs impacts positifs ou négatifs sur les communautés microbiennes des sols à court, moyen mais aussi à long terme.

3.3. Effectuer des essais à long terme

Nos résultats et conclusions correspondent à des évaluations de la sensibilité des bioindicateurs menées à court/moyen terme. De fait, des interrogations subsistent quant à la réactivité des bioindicateurs à plus long terme. En effet, à partir de combien de temps est-il possible d'observer la résilience de l'effet de pratiques agricoles négatives sur les communautés microbiennes des sols ? Quelle est la durée nécessaire à la réhabilitation de sols pollués ? De plus, il est reconnu qu'à long terme les cultures pérennes tendent à diminuer la biodiversité de la faune du sol mais aussi des oiseaux et d'autres espèces végétales (Dauber et al., 2010). Plusieurs questions se posent donc : qu'advient-il de la diversité microbienne sous culture pérenne à long terme ? Est-il vraiment intéressant de relancer l'économie de sols pollués si en retour la pratique effectuée pour y parvenir tend à impacter négativement la biodiversité de ces sols ? Afin de répondre à ces questions, il paraît donc primordial de pérenniser les dispositifs expérimentaux pour pouvoir évaluer ces différents modes d'usage agricoles sur le long terme.

3.4. Développer des référentiels d'interprétation

Afin d'être utilisé en routine, un bioindicateur nécessite d'être robuste techniquement et sensible aux variations de gestion des sols. Pour une utilisation en tant qu'outils d'aide à la décision des modes de gestion des sols, un bioindicateur doit également être associé à un référentiel d'interprétation. Un référentiel permet de définir une gamme de « valeurs normales » de l'indicateur pour un environnement pédoclimatique donné. Le positionnement des valeurs mesurées dans un référentiel permet donc d'évaluer l'impact de l'utilisation du sol sur le bioindicateur et ainsi d'établir un diagnostic de l'état microbiologique du sol. Très peu de ces référentiels existent actuellement mais leur mise en place commence à se développer à partir de bases de données comprenant un grand nombre de valeurs des bioindicateurs mesurées sur une large gamme de sols représentatifs de la variabilité des propriétés

physicochimiques et de mode d'usage au niveau national avec le RMQS (Réseau de Mesures de la Qualité des Sols) mais aussi au niveau départemental avec le développement d'un référentiel sur les communautés microbiennes de sols de cultures et de prairies de Saône-et-Loire (communication personnelle). Des modèles de prédiction de la biomasse moléculaire microbienne et la diversité taxonomique des communautés de bactéries et de champignons sont notamment en cours de développement (Horrigue et al. soumis). Dans ce contexte, une perspective serait d'appliquer les bioindicateurs testés dans ce travail sur des échantillonnages représentatifs de modes d'usages ciblés (*i.e.* culture, prairie, voire plus fin avec prise en compte de certaines pratiques comme le travail du sol, la gestion des résidus,...) afin de développer des outils de diagnostics adaptés à la variabilité des modes de conduites des exploitations.

3.5. Faire le lien entre la diversité et le fonctionnement biologique du sol

Obtenir des informations sur la biomasse et la diversité taxonomique des communautés microbiennes telluriques est important pour estimer la qualité des sols. En effet, il est connu que la diversité des microorganismes du sol est importante pour la stabilité et l'activité des communautés de bactéries et de champignons impliquées dans les transformations de la matière organique du sol, une fonction déterminante pour la fertilité des sols (Tardy et al., 2014). Dans la continuité des travaux de cette thèse, il apparaît nécessaire de déterminer la signification fonctionnelle réelle des bioindicateurs que l'on a pris en compte pour différentes fonctions d'intérêt comme la décomposition de la matière organique (Baumann et al., 2012), la nitrification et la dénitrification (Philippot et al., 2013), la décontamination de sols pollués (Mougin et al., 1996; Martin-Laurent et al., 2004). Pour cela, des approches expérimentales spécifiques en microcosmes ou en mésocosmes pourraient être effectuées consistant à coupler des outils d'écologie fonctionnelle (mesure d'émissions de CO₂ suite à un apport de résidus végétal marqué au ¹³C ou des émissions de N₂O) en faisant varier nos bioindicateurs, la biomasse moléculaire microbienne et la diversité taxonomique des bactéries et des champignons, par des études sur leurs dilutions.

Références bibliographiques

- Abbott, L. K., & Robson, A. D. (1984). The effect of VA mycorrhizae on plant growth.
- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., ... Spiegel, F. W. (2012). The revised classification of eukaryotes. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59(5), 429–93. <http://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x>
- Adler, P. R., Sanderson, M. A., Boateng, A. A., Weimer, P. J., & Jung, H.-J. G. (2006). Biomass Yield and Biofuel Quality of Switchgrass Harvested in Fall or Spring. *Agronomy Journal*, 98(6), 1518. <http://doi.org/10.2134/agronj2005.0351>
- Alabouvette, C., Lemanceau, P., & Steinberg, C. (1993). Recent advances in the biological control of fusarium wilts. *Pesticide Science*, 37, 365–373. <http://doi.org/10.1002/ps.2780370409>
- Allen, M. F., Swenson, W., Querejeta, J. I., Egerton-Warburton, L. M., & Treseder, K. K. (2003). Ecology of Mycorrhizae : A Conceptual Framework for Complex Interactions Among Plants and Fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 41(1), 271–303. <http://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095518>
- Allen, T. R., Millar, T., Berch, S. M., & Berbee, M. L. (2003). Culturing and direct DNA extraction find different fungi from the same ericoid mycorrhizal roots. *New Phytologist*, 160(1), 255–272. <http://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00885.x>
- Altieri, M. A. (1999). The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 74(1-3), 19–31. [http://doi.org/10.1016/S0167-8809\(99\)00028-6](http://doi.org/10.1016/S0167-8809(99)00028-6)
- Altieri, M. A. (2002). Agroecology: the science of natural resource management for poor farmers in marginal environments. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 93(1-3), 1–24. [http://doi.org/10.1016/S0167-8809\(02\)00085-3](http://doi.org/10.1016/S0167-8809(02)00085-3)
- Alvarez, C. R., & Alvarez, R. (2000). Short-term effects of tillage systems on active soil microbial biomass. *Biology and Fertility of Soils*, 31(2), 157–161. <http://doi.org/10.1007/s003740050639>
- Amprayn, K., Rose, M. T., Kecskés, M., Pereg, L., Nguyen, H. T., & Kennedy, I. R. (2012). Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth. *Applied Soil Ecology*, 61, 295–299. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.11.009>
- April, T. M., Abbott, S. P., Foght, J. M., & Currah, R. S. (1998). Degradation of hydrocarbons in crude oil by the ascomycete *Pseudallescheria boydii* (Microascaceae). *Canadian Journal of Microbiology*, 44(3), 270–278. <http://doi.org/10.1139/w97-152>
- Ashraf, M., Hasnain, S., & Berge, O. (2013). Bacterial Exo-Polysaccharides: A Biological Tool for the Reclamation of Salt-Affected Soils. In *Developments in Soil Salinity Assessment and Reclamation*, 641–658.
- Aslam, T., Choudhary, M. A., & Saggar, S. (1999). Tillage impacts on soil microbial biomass C, N and P, earthworms and agronomy after two years of cropping following permanent pasture in New Zealand. *Soil and Tillage Research*, 51(1–2), 103–111. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0167-1987\(99\)00032-X](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0167-1987(99)00032-X)

- Bååth, E., Frostegård, Å., & Campbell, D. (1998). Effect of Metal-Rich Sludge Amendments on the Soil Microbial Community Effect of Metal-Rich Sludge Amendments on the Soil Microbial Community. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1), 238–245.
- Babujia, L. C., Hungria, M., Franchini, J. C., & Brookes, P. C. (2010). Microbial biomass and activity at various soil depths in a Brazilian oxisol after two decades of no-tillage and conventional tillage. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(12), 2174–2181. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.08.013>
- Baker, B. J., & Banfield, J. F. (2003). Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiology Ecology*, 44(2), 139–152. [http://doi.org/10.1016/s0168-6496\(03\)00028-x](http://doi.org/10.1016/s0168-6496(03)00028-x)
- Baldrian, P., & Šnajdr, J. (2006). Production of ligninolytic enzymes by litter-decomposing fungi and their ability to decolorize synthetic dyes. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(5), 1023–1029. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.02.011>
- Baldrian, P., & Valášková, V. (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(3), 501–521. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00106.x>
- Baldrian, P., Voříšková, J., Dobiášová, P., Merhautová, V., Lisá, L., & Valášková, V. (2011). Production of extracellular enzymes and degradation of biopolymers by saprotrophic microfungi from the upper layers of forest soil. *Plant and Soil*, 338, 111–125. <http://doi.org/10.1007/s11104-010-0324-3>
- Balota, E. L., Colozzi Filho, A., Andrade, D. S., & Dick, R. P. (2004). Long-term tillage and crop rotation effects on microbial biomass and C and N mineralization in a Brazilian Oxisol. *Soil and Tillage Research*, 77(2), 137–145. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.still.2003.12.003>
- Banerjee, B., Aggarwal, P. K., Pathak, H., Singh, A. K., & Chaudhary, A. (2006). Dynamics of Organic Carbon and Microbial Biomass in Alluvial Soil With Tillage and Amendments in Rice-wheat Systems. *Environmental Monitoring and Assessment*, 119(1-3), 173–189. <http://doi.org/10.1007/s10661-005-9021-8>
- Bardgett, R. D. (2005). *The biology of soil: a community and ecosystem approach*.
- Barrios, E. (2007). Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecological Economics*, 64(2), 269–285. <http://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2007.03.004>
- Battaglia-Brunet, F., Itard, Y., Garrido, F., Delorme, F., Crouzet, C., Greffié, C., ... Greffie, C. (2006). A simple biogeochemical process removing arsenic from a mine drainage water. *Geomicrobiology Journal*, 23(3-4), 201–211 ST – A simple biogeochemical process remo. <http://doi.org/10.1080/01490450600724282>
- Baumann, K., Dignac, M.-F., Rumpel, C., Bardoux, G., Sarr, A., Steffens, M., & Maron, P.-A. (2013). Soil microbial diversity affects soil organic matter decomposition in a silty grassland soil. *Biogeochemistry*, 114(1-3), 201–212. <http://doi.org/10.1007/s10533-012-9800-6>
- Béguin, P., Aubert, J.-P., & Béguin, P. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews*, 13(1), 25–58. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00033.x>

- Bending, G. D., Turner, M. K., Rayns, F., Marx, M.-C., & Wood, M. (2004). Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(11), 1785–1792. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.04.035>
- Berg, G., Eberl, L., & Hartmann, A. (2005). The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology*, 7(11), 1673–85. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00891.x>
- Berner, A., Hildermann, I., Fliesbach, A., Pfiffner, L., Niggli, U., & Mader, P. (2008). Crop yield and soil fertility response to reduced tillage under organic management. *Soil and Tillage Research*, 101(1-2), 89–96. <http://doi.org/10.1016/j.still.2008.07.012>
- Bispo, a., Grand, C., & Galsomies, L. (2008). Le programme ADEME “Bioindicateurs de qualité des sols” : *Etude et Gestion Des Sols*, 16, 145–158.
- Blair, J. M., Bohlen, P. J., & Freckman, D. W. (1996). Soil Invertebrates as Indicators of Soil Quality, 273–291.
- Blakely, J. K., Neher, D. a., & Spongberg, A. L. (2002). Soil invertebrate and microbial communities, and decomposition as indicators of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination. *Applied Soil Ecology*, 21(1), 71–88. [http://doi.org/10.1016/S0929-1393\(02\)00023-9](http://doi.org/10.1016/S0929-1393(02)00023-9)
- Blandin, P. (1986). Bioindicateurs et diagnostic des systemes ecologiques. *Bulletin D'écologie*.
- Blaxter, M., Mann, J., Chapman, T., Thomas, F., Whitton, C., Floyd, R., & Abebe, E. (2005). Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1935–1943.
- Boer, W. de, Folman, L. B., Summerbell, R. C., & Boddy, L. (2005). Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(4), 795–811. <http://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.11.005>
- Bonnefond, P. (1970). L'introduction de la motorisation en agriculture traditionnelle, VII(4).
- Bottomley, P. J., Cheng, H. H., & Strain, S. R. (1994). Genetic structure and symbiotic characteristics of a bradyrhizobium population recovered from a pasture soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6), 1754–61. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=201558&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Bouchez, M., Blanchet, D., Vandecasteele, J. P., & Haeseler, F. (1996). Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement. Première partie. Propriété, origines, devenir. *Oil & Gas Science and Technology*, 51(3), 407–419. <http://doi.org/10.2516/ogst:1996031>
- Bouchez, M., Blanchet, D., Vandecasteele, J. P., & Haeseler, F. (1996). Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement. Première partie. Propriété, origines, devenir. *Oil & Gas Science and Technology*, 51(3), 407–419.

- Bourgeois, E., Dequiedt, S., Lelièvre, M., van Oort, F., Lamy, I., Maron, P.-A., & Ranjard, L. (2015). Positive effect of the *Miscanthus* bioenergy crop on microbial diversity in wastewater-contaminated soil. *Environmental Chemistry Letters*. <http://doi.org/10.1007/s10311-015-0531-5>
- Bourgeois, E., Dequiedt, S., Lelièvre, M., van Oort, F., Lamy, I., Ranjard, L., & Maron, P. A. (2015). *Miscanthus* bioenergy crop stimulates nutrient-cycler bacteria and fungi in wastewater-contaminated agricultural soil. *Environmental Chemistry Letters*. <http://doi.org/10.1007/s10311-015-0532-4>
- Brandl, H., & Faramarzi, M. A. (2006). Microbe-metal-interactions for the biotechnological treatment of metal-containing solid waste. *China Particuology*, 4(2), 93–97.
- Bressan, M., Mougél, C., Dequiedt, S., Maron, P.-A., Lemanceau, P., & Ranjard, L. (2008). Response of soil bacterial community structure to successive perturbations of different types and intensities. *Environmental Microbiology*, 10(8), 2184–2187. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01641.x>
- Bronick, C. J., & Lal, R. (2005). Soil structure and management: a review. *Geoderma*, 124(1), 3–22.
- Brussaard, L. (1998). Soil fauna, guilds, functional groups and ecosystem processes. *Applied Soil Ecology*, 9(1-3), 123–135. [http://doi.org/10.1016/S0929-1393\(98\)00066-3](http://doi.org/10.1016/S0929-1393(98)00066-3)
- Buckley, D. H., Graber, J. R., & Schmidt, T. M. (1998). Phylogenetic analysis of nonthermophilic members of the kingdom Crenarchaeota and their diversity and abundance in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4333–4339.
- Buée, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R. H., Uroz, S., & Martin, F. (2009). 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist*, 184(2), 449–456. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03003.x>
- Butchart S. H. M., Walpole M., Collen B., van Strien A., Scharlemann J. P. W., Almond R. E. A., Bomhard B., Brown C., Bruno J., Carpenter K. E., Carr G.M., Chanson J., Chenery A. M., Csirke J., Davidson N.C., Dentener F., Foster M., Galli A., Galloway J. , W. R. (2010). Global Biodiversity : Indicators of, (May), 1164–1169. <http://doi.org/10.1126/science.1187512>
- Butinar, L., Santos, S., Spencer-Martins, I., Oren, a., & Gunde-Cimerman, N. (2005). Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiology Letters*, 244(2), 229–234. <http://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.01.043>
- Büttner, D., & Bonas, U. (2003). Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(4), 312–319. [http://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00064-5](http://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00064-5)
- Carpenter, S. R., Mooney, H. A., Agard, J., Capistrano, D., Defries, R. S., Díaz, S., ... Whyte, A. (2009). Science for managing ecosystem services: Beyond the Millennium Ecosystem Assessment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(5), 1305–1312. <http://doi.org/10.1073/pnas.0808772106>

- Carter, M. R., Gregorich, E. G., Angers, D. A., Beare, M. H., Sparling, G. P., Wardle, D. A., & Voroney, R. P. (1999). Interpretation of microbial biomass measurements for soil quality assessment in humid temperate regions. *Canadian Journal of Soil Science*, 79(4), 507–520.
- Chang, Y. J., Peacock, A. D., Long, P. E., Stephen, J. R., McKinley, J. P., Macnaughton, S. J., ... White, D. C. (2001). Diversity and characterization of sulfate-reducing bacteria in groundwater at a uranium mill tailings site. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 3149–60. <http://doi.org/10.1128/AEM.67.7.3149-3160.2001>
- Chau, J. F., Bagtzoglou, A. C., & Willig, M. R. (2011). The Effect of Soil Texture on Richness and Diversity of Bacterial Communities. *Environmental Forensics*, 12(4), 333–341. <http://doi.org/10.1080/15275922.2011.622348>
- Chauvat, M., Perez, G., Hedde, M., & Lamy, I. (2014). Establishment of bioenergy crops on metal contaminated soils stimulates belowground fauna. *Biomass and Bioenergy*, 62, 207–211. <http://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.01.042>
- Chemidlin Prévost-Bouré, N., Christen, R., Dequiedt, S., Mougél, C., Lelièvre, M., Jolivet, C., ... Ranjard, L. (2011). Validation and Application of a PCR Primer Set to Quantify Fungal Communities in the Soil Environment by Real-Time Quantitative PCR. *PLoS ONE*, 6(9), e24166. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0024166>
- Christensen, M. (1989). A view of fungal ecology. *Mycologia*, 1–19.
- Cleveland, C. C., Townsend, A. R., Schimel, D. S., Fisher, H., Hedin, L. O., Perakis, S., ... Wasson, M. F. (1999). Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N_z) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles*, 13(2), 623–645. <http://doi.org/10.1029/1999GB900014>
- Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., ... Tiedje, J. M. (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 37(Database), D141–D145. <http://doi.org/10.1093/nar/gkn879>
- Colman, B. P., & Schimel, J. P. (2013). Drivers of microbial respiration and net N mineralization at the continental scale. *Soil Biology and Biochemistry*, 60, 65–76. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.01.003>
- Conrad, R. (1996). Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiological Reviews*, 60(4), 609–640.
- Constancias, F., Prévost-Bouré, N. C., Terrat, S., Aussems, S., Nowak, V., Guillemin, J.-P., ... Ranjard, L. (2014). Microscale evidence for a high decrease of soil bacterial density and diversity by cropping. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(4), 831–840. <http://doi.org/10.1007/s13593-013-0204-3>
- Constancias, F., Terrat, S., Saby, N. P. A., Horrigue, W., Villerd, J., Guillemin, J.-P., ... Chemidlin Prévost-Bouré, N. (2015). Mapping and determinism of soil microbial community distribution across an agricultural landscape. *MicrobiologyOpen*, 4(3), 505–517. <http://doi.org/10.1002/mbo3.255>

- Cortet, J., Gomot-De Vauflery, A., Poinso-Balaguer, N., Gomot, L., Texier, C., & Cluzeau, D. (1999). The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. *European Journal of Soil Biology*, 35(3), 115–134.
- Crouzet, O., Batisson, I., Besse-Hoggan, P., Bonnemoy, F., Bardot, C., Poly, F., ... Mallet, C. (2010). Response of soil microbial communities to the herbicide mesotrione: A dose-effect microcosm approach. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(2), 193–202. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.10.016>
- Curtis, T. P., & Sloan, W. T. (2005). Exploring Microbial Diversity— A Vast Below. *Science*, 309(5998), 2004–2006. <http://doi.org/10.1126/science.1118176>
- Dauber, J., Jones, M. B., & Stout, J. C. (2010). The impact of biomass crop cultivation on temperate biodiversity. *GCB Bioenergy*, 2(6), 289–309. <http://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2010.01058.x>
- De Deyn, G. B., Quirk, H., & Bardgett, R. D. (2010). Plant species richness, identity and productivity differentially influence key groups of microbes in grassland soils of contrasting fertility. *Biology Letters*.
- De Groot, R. S., Wilson, M. a., & Boumans, R. M. J. (2002). A typology for the classification, description and valuation of ecosystem functions, goods and services. *Ecological Economics*, 41(3), 393–408. [http://doi.org/10.1016/S0921-8009\(02\)00089-7](http://doi.org/10.1016/S0921-8009(02)00089-7)
- De Maria, S., Rivelli, A. R., Kuffner, M., Sessitsch, A., Wenzel, W. W., Gorfer, M., ... Puschenreiter, M. (2011). Interactions between accumulation of trace elements and macronutrients in *Salix caprea* after inoculation with rhizosphere microorganisms. *Chemosphere*, 84(9), 1256–1261. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.05.002>
- de Santiago-Martín, A., Cheviron, N., Quintana, J. R., González, C., Lafuente, A. L., & Mougin, C. (2013). Metal Contamination Disturbs Biochemical and Microbial Properties of Calcareous Agricultural Soils of the Mediterranean Area. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 64(3), 388–398. <http://doi.org/10.1007/s00244-012-9842-8>
- Del Val, C., Barea, J. M., & Azcón-Aguilar, C. (1999). Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungus Populations in Heavy-Metal-Contaminated Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), 718–723. <http://aem.asm.org/content/65/2/718.abstract>
- Delmont, T. O., Robe, P., Cecillon, S., Clark, I. M., Constancias, F., Simonet, P., ... Vogel, T. M. (2011). Accessing the Soil Metagenome for Studies of Microbial Diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1315–1324. <http://doi.org/10.1128/AEM.01526-10>
- Delmont, T. O., Robe, P., Clark, I., Simonet, P., & Vogel, T. M. (2011). Metagenomic comparison of direct and indirect soil DNA extraction approaches. *Journal of Microbiological Methods*, 86(3), 397–400. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2011.06.013>
- Demergasso, C., Casamayor, E. O., Chong, G., Galleguillos, P., Escudero, L., & Pedrós-Alió, C. (2004). Distribution of prokaryotic genetic diversity in athalassohaline lakes of the Atacama Desert, Northern Chile. *FEMS Microbiology Ecology*, 48(1), 57–69. <http://doi.org/10.1016/j.femsec.2003.12.013>

- Dequiedt, S., Saby, N. P. A., Lelievre, M., Jolivet, C., Thioulouse, J., Toutain, B., ... Ranjard, L. (2011). Biogeographical patterns of soil molecular microbial biomass as influenced by soil characteristics and management. *Global Ecology and Biogeography*, 20(4), 641–652. <http://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2010.00628.x>
- Dionisi, H. M., Layton, A. C., Harms, G., Gregory, I. R., Robinson, K. G., Sayler, G. S., & Gregory, I. R. (2002). Quantification of Nitrosomonas oligotropha -Like Ammonia-Oxidizing Bacteria and Nitrospira spp. from Full-Scale Wastewater Treatment Plants by Competitive PCR Quantification of Nitrosomonas oligotropha-Like Ammonia- Oxidizing Bacteria and Nitrospira spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), 245–253. <http://doi.org/10.1128/AEM.68.1.245>
- Donn, S., Griffiths, B. S., Neilson, R., & Daniell, T. J. (2008). DNA extraction from soil nematodes for multi-sample community studies. *Applied Soil Ecology*, 38(1), 20–26. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.08.006>
- Doran, J. W. (1987). Microbial biomass and mineralizable nitrogen distributions in no-tillage and plowed soils. *Biology and Fertility of Soils*, 5(1), 68–75.
- Doran, J. W., & Zeiss, M. R. (2000). Soil health and sustainability: Managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, 15(1), 3–11. [http://doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00067-6](http://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00067-6)
- DuPont, S. T., Culman, S. W., Ferris, H., Buckley, D. H., & Glover, J. D. (2010). No-tillage conversion of harvested perennial grassland to annual cropland reduces root biomass, decreases active carbon stocks, and impacts soil biota. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 137(1-2), 25–32. <http://doi.org/10.1016/j.agee.2009.12.021>
- Duraiappah, A. K., Naeem, S., Agardy, T., Ash, N. J., Cooper, H. D., Díaz, S., ... Jaarsve, A. Van. (2005). Ecosystems and human well-being. *Ecosystems*, 5(281), 1–100. <http://doi.org/10.1196/annals.1439.003>
- Eichlerová, I., Homolka, L., Žifčáková, L., Lisá, L., Dobiášová, P., & Baldrian, P. (2015). Enzymatic systems involved in decomposition reflects the ecology and taxonomy of saprotrophic fungi. *Fungal Ecology*, 13, 10–22. <http://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.08.002>
- El Fantroussi, S., Verschuere, L., Verstraete, W., & Top, E. M. (1999). Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 982–988.
- Embley, T. M., & Williams, T. A. (2015). Steps on the road to eukaryotes. *Nature*, 521(7551), 169–170. <http://doi.org/10.1038/nature14522>
- Epelde, L., Burges, A., Mijangos, I., & Garbisu, C. (2014). Microbial properties and attributes of ecological relevance for soil quality monitoring during a chemical stabilization field study. *Applied Soil Ecology*, 75, 1–12. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.10.003>
- Evangelou, M. W., Conesa, H. M., Robinson, B. H., & Schulin, R. (2012). Biomass production on trace element–contaminated land: a review. *Environmental Engineering Science*, 29(9), 823–839.

- Fahrbach, M., Kuever, J., Remesch, M., Huber, B. E., Kampfer, P., Dott, W., & Hollender, J. (2008). *Steroidobacter denitrificans* gen. nov., sp. nov., a steroidal hormone-degrading gammaproteobacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(9), 2215–2223. <http://doi.org/10.1099/ij.s.0.65342-0>
- Feinstein, L. M., Sul, W. J., & Blackwood, C. B. (2009). Assessment of Bias Associated with Incomplete Extraction of Microbial DNA from Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(16), 5428–5433. <http://doi.org/10.1128/AEM.00120-09>
- Ferrocino, I., Pugliese, M., Gilardi, G., Gullino, M. L., & Garibaldi, A. (2013). Analysis by PCR-DGGE of microflora in soil treated with different ammendments. *Protezione Delle Colture*, 2, 67–68.
- Fierer, N., & Jackson, R. B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(3), 626–631. <http://doi.org/10.1073/pnas.0507535103>
- Fierer, N., & Ladau, J. (2012). Predicting microbial distributions in space and time. *Nature Methods*, 9(6), 549–551.
- Foley, J. a, Defries, R., Asner, G. P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S. R., ... Snyder, P. K. (2005). Global consequences of land use. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5734), 570–4. <http://doi.org/10.1126/science.1111772>
- Fontaine, S., Bardoux, G., Abbadie, L., & Mariotti, A. (2004). Carbon input to soil may decrease soil carbon content. *Ecology Letters*, 7(4), 314–320. <http://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00579.x>
- Fontaine, S., Mariotti, A., & Abbadie, L. (2003). The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biology and Biochemistry*, 35(6), 837–843. [http://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00123-8](http://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00123-8)
- Fornasier, F., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Tomat, E., & Pietramellara, G. (2014). A simplified rapid, low-cost and versatile DNA-based assessment of soil microbial biomass. *Ecological Indicators*, 45, 75–82. <http://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.03.028>
- Fredricks, D. N., Smith, C., & Meier, A. (2005). Comparison of Six DNA Extraction Methods for Recovery of Fungal DNA as Assessed by Quantitative PCR Comparison of Six DNA Extraction Methods for Recovery of Fungal DNA as Assessed by Quantitative PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(10), 5122–5128. <http://doi.org/10.1128/JCM.43.10.5122>
- Friedrich, C. G., Bardischewsky, F., Rother, D., Quentmeier, A., & Fischer, J. (2005). Prokaryotic sulfur oxidation. *Current Opinion in Microbiology*, 8(3), 253–259. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2005.04.005>
- Frostegård, Å., Tunlid, A., & Bååth, E. (2011). Use and misuse of PLFA measurements in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(8), 1621–1625. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.11.021>
- Fulthorpe, R. R., Roesch, L. F. W., Riva, A., & Triplett, E. W. (2008). Distantly sampled soils carry few species in common. *The ISME Journal*, 2(9), 901–910. <http://doi.org/10.1038/ismej.2008.55>

- Fumi, M. D., Mazzoleni, V., Novelli, E., Galli, R., Busconi, M., Blaghen, M., ... Mclellan, I. (2014). Pedologic characteristics and fungi community in unmanaged cork oak forest soil of two Mediterranean regions : Sardinia and Tunisia, *101*, 31–38.
- Gadd, G. M. (2010). Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, *156*(3), 609–643. <http://doi.org/10.1099/mic.0.037143-0>
- Garbeva, P., van Veen, J. A., & van Elsas, J. D. (2004). Microbial diversity in soil: Selection of Microbial Populations by Plant and Soil Type and Implications for Disease Suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, *42*(1), 243–270. <http://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.012604.135455>
- Garbisu, C., & Alkorta, I. (1999). Utilization of genetically engineered microorganisms (GEMs) for bioremediation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *74*(7), 599–606.
- Gattinger, A., Höfle, M. G., Schlöter, M., Embacher, A., Böhme, F., Munch, J. C., & Labrenz, M. (2007). Traditional cattle manure application determines abundance, diversity and activity of methanogenic Archaea in arable European soil. *Environmental Microbiology*, *9*(3), 612–624. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01181.x>
- George, E., Häussler, K. U., Vetterlein, D., Gorgus, E., & Marschner, H. (1992). Water and nutrient translocation by hyphae of *Glomus mosseae*. *Canadian Journal of Botany*, *70*(11), 2130–2137.
- Giller, K. E., Witter, E., & Mcgrath, S. P. (1998). Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. *Soil Biology and Biochemistry*, *30*(10-11), 1389–1414. [http://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00270-8](http://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00270-8)
- Giller, K. E., Witter, E., & McGrath, S. P. (2009). Heavy metals and soil microbes. *Soil Biology and Biochemistry*, *41*(10), 2031–2037. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.04.026>
- Girvan, M. S., Campbell, C. D., Killham, K., Prosser, J. I., & Glover, L. a. (2005). Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environmental Microbiology*, *7*(3), 301–313. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00695.x>
- Gladieux, P., Ropars, J., Badouin, H., Branca, A., Aguilera, G., De Vienne, D. M., ... Giraud, T. (2014). Fungal evolutionary genomics provides insight into the mechanisms of adaptive divergence in eukaryotes. *Molecular Ecology*, *23*(4), 753–773. <http://doi.org/10.1111/mec.12631>
- Gliessman, S. R. (1990). Agroecology: researching the ecological basis for sustainable agriculture.
- Gobat, J. M., Aragno, M., & Matthey, W. (2010). *Le sol vivant: bases de p{é}dologie, biologie des sols*.
- Goh, T., Hyde, K. D., & Ho, W. H. (1999). A revision of the genus *Dictyosporium* , three new species with descriptions of. *Fungal Diversity*, *2*(March), 65–100.
- Gómez-Sagasti, M., Alkorta, I., Becerril, J., Epelde, L., Anza, M., & Garbisu, C. (2012). Microbial Monitoring of the Recovery of Soil Quality During Heavy Metal Phytoremediation. *Water, Air, & Soil Pollution*, *223*(6), 3249–3262. <http://doi.org/10.1007/s11270-012-1106-8>

- Grandaubert, J., Balesdent, M. H., & Rouxel, T. (2013). Incidence des Éléments Transposables sur l'évolution des génomes des champignons phytopathogènes et sur leur potentiel adaptatif. *Biologie Aujourd'hui*, 207(4), 277–290.
- Gregorich, E. G., Monreal, C. M., Carter, M. R., Angers, D. A., & Ellert, B. (1994). Towards a minimum data set to assess soil organic matter quality in agricultural soils. *Canadian Journal of Soil Science*, 74(4), 367–385.
- Griffiths, B. S., Bonkowski, M., Roy, J., & Ritz, K. (2001). Functional stability, substrate utilisation and biological indicators of soils following environmental impacts. *Applied Soil Ecology*, 16, 49–61. [http://doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00081-0](http://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00081-0)
- Griffiths, B. S., & Caul, S. (1993). Migration of bacterial-feeding nematodes, but not protozoa, to decomposing grass residues. *Biology and Fertility of Soils*, 15(3), 201–207. <http://doi.org/10.1007/BF00361612>
- Griffiths, B. S., & Philippot, L. (2013). Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(2), 112–129. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00343.x>
- Gros, R., Jocteur Monrozier, L., Bartoli, F., Chotte, J. L., & Faivre, P. (2004). Relationships between soil physico-chemical properties and microbial activity along a restoration chronosequence of alpine grasslands following ski run construction. *Applied Soil Ecology*, 27, 7–22. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2004.03.004>
- Gruber, N., & Galloway, J. N. (2008). An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, 451(7176), 293–296. <http://doi.org/10.1038/nature06592>
- Guénon, R., Vennetier, M., Dupuy, N., Roussos, S., Pailler, a., & Gros, R. (2013). Trends in recovery of mediterranean soil chemical properties and microbial activities after infrequent and frequent wildfires. *Land Degradation and Development*, 24(2), 115–128. <http://doi.org/10.1002/ldr.1109>
- Guo, J., Tang, S., Ju, X., Ding, Y., Liao, S., & Song, N. (2011). Effects of inoculation of a plant growth promoting rhizobacterium Burkholderia sp. D54 on plant growth and metal uptake by a hyperaccumulator Sedum alfredii Hance grown on multiple metal contaminated soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(12), 2835–2844. <http://doi.org/10.1007/s11274-011-0762-y>
- Hallin, S., Jones, C. M., Schlöter, M., & Philippot, L. (2009). Relationship between N-cycling communities and ecosystem functioning in a 50-year-old fertilization experiment. *The ISME Journal*, 3(5), 597–605.
- Hallmann, J., Quadts-Hallmann, a., Mahaffee, W. F., & Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(10), 895–914. <http://doi.org/10.1139/m97-131>
- Hammel, K. (1997). Fungal degradation of lignin. *Driven by Nature: Plant Litter Quality and Decomposition.*, 33–45. Retrieved from <http://www.fpl.fs.fed.us/documnts/pdf1997/hamme97a.pdf>

- Han, J.-G., Hosoya, T., Sung, G.-H., & Shin, H.-D. (2014). Phylogenetic reassessment of Hyaloscyphaceae sensu lato (Helotiales, Leotiomycetes) based on multigene analyses. *Fungal Biology*, 118(2), 150–167. <http://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.11.004>
- Haritash, A. K., & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a
- Hayatsu, M., Tago, K., & Saito, M. (2008). Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54(1), 33–45. <http://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2007.00195.x>
- Haynes, R. J., & Francis, G. S. (1993). Changes in microbial biomass C, soil carbohydrate composition and aggregate stability induced by growth of selected crop and forage species under field conditions. *Journal of Soil Science*, 44, 665–675. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2389.1993.tb02331.x>
- He, Z., Piceno, Y., Deng, Y., Xu, M., Lu, Z., DeSantis, T., ... Zhou, J. (2012). The phylogenetic composition and structure of soil microbial communities shifts in response to elevated carbon dioxide. *The ISME Journal*, 6(2), 259–272. <http://doi.org/10.1038/ismej.2011.99>
- Hedde, M., van Oort, F., Boudon, E., Abonnel, F., & Lamy, I. (2013). Responses of soil macroinvertebrate communities to Miscanthus cropping in different trace metal contaminated soils. *Biomass and Bioenergy*, 55(0), 122–129. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.01.016>
- Hedde, M., van Oort, F., & Lamy, I. (2012). Functional traits of soil invertebrates as indicators for exposure to soil disturbance. *Environmental Pollution*, 164(0), 59–65. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2012.01.017>
- Hedde, M., van Oort, F., Renouf, E., Thénard, J., & Lamy, I. (2013). Dynamics of soil fauna after plantation of perennial energy crops on polluted soils. *Applied Soil Ecology*, 66(0), 29–39. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.01.012>
- Hedde, M., Aubert, M., Bureau, F., Margerie, P., & Decaëns, T. (2007). Soil detritivore macroinvertebrate assemblages throughout a managed beech rotation. *Annals of Forest Science*, 64(2), 219–228.
- Heemsbergen, D. a, Berg, M. P., Loreau, M., van Hal, J. R., Faber, J. H., & Verhoef, H. a. (2004). Biodiversity effects on soil processes explained by interspecific functional dissimilarity. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5698), 1019–1020. <http://doi.org/10.1126/science.1101865>
- Helgason, B. L., Walley, F. L., & Germida, J. J. (2010). No-till soil management increases microbial biomass and alters community profiles in soil aggregates. *Applied Soil Ecology*, 46(3), 390–397. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.10.002>
- Helgason, T., Daniell, T. J., Husband, R., Fitter, a H., & Young, J. P. (1998). Ploughing up the wood-wide web? *Nature*, 394(6692), 431. <http://doi.org/10.1038/28764>
- Hidri, Y., Bouziri, L., Maron, P.-A., Anane, M., Jedidi, N., Hassan, A., & Ranjard, L. (2010). Soil DNA evidence for altered microbial diversity after long-term application of municipal

- wastewater. *Agronomy for Sustainable Development*, 30(2), 423–431. <http://doi.org/10.1051/agro/2009038>
- Hill, M. (1973). Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology*, 54(2), 427–432. <http://doi.org/10.2307/1934352>
- Holland, J. M. (2004). The environmental consequences of adopting conservation tillage in Europe: Reviewing the evidence. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 103(1), 1–25. <http://doi.org/10.1016/j.agee.2003.12.018>
- Holland, E. A., & Coleman, D. C. (1987). Litter placement effects on microbial and organic matter dynamics in an agroecosystem. *Ecology*, 425–433.
- Hong, C., Si, Y., Xing, Y., & Li, Y. (2015). Illumina MiSeq sequencing investigation on the contrasting soil bacterial community structures in different iron mining areas. *Environmental Science and Pollution Research*, 10788–10799. <http://doi.org/10.1007/s11356-015-4186-3>
- Hugenholtz, P., Hugenholtz, P., Goebel, B. M., Goebel, B. M., Pace, N. R., & Pace, N. R. (1998). Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, v(18), 180p4765–4774. [http://doi.org/0021-9193/98/\\$04.00+0](http://doi.org/0021-9193/98/$04.00+0)
- Immerzeel, D. J., Verweij, P. a., van der Hilst, F., & Faaij, A. P. C. (2014). Biodiversity impacts of bioenergy crop production: A state-of-the-art review. *GCB Bioenergy*, 6(3), 183–209. <http://doi.org/10.1111/gcbb.12067>
- İnceoğlu, Ö., Hoogwout, E. F., Hill, P., & van Elsas, J. D. (2010). Effect of DNA extraction method on the apparent microbial diversity of soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(10), 3378–3382. <http://doi.org/10.1128/AEM.02715-09>
- Iqbal, M., Bermond, A., & Lamy, I. (2013). Impact of miscanthus cultivation on trace metal availability in contaminated agricultural soils: Complementary insights from kinetic extraction and physical fractionation. *Chemosphere*, 91(3), 287–294. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.11.032>
- Iram, S., Ahmad, I., & Stuben, D. (2009). Analysis of mines and contaminated agricultural soil samples for fungal diversity and tolerance to heavy metals. *Pakistan Journal of Botany*, 41(2), 885–895.
- Jacinthe, P.-A., & Lal, R. (2009). Tillage Effects on Carbon Sequestration and Microbial Biomass in Reclaimed Farmland Soils of Southwestern Indiana. *Soil Science Society of America Journal*, 73(2), 605. <http://doi.org/10.2136/sssaj2008.0156>
- Jaklitsch, W. M., Komon, M., Kubicek, C. P., & Druzhinina, I. S. (2005). *Hypocrea voglmayrii* sp. nov. from the Austrian Alps represents a new phylogenetic clade in *Hypocrea*/Trichoderma. *Mycologia*, 97(6), 1365–1378. <http://doi.org/10.3852/mycologia.97.6.1365>
- Jeffery, S., Gardi, C., Jones, A., Montanarella, L., Marmo, L., Miko, L., ... & Krogh, P. H. (2010). European atlas of soil biodiversity.

- Jenkinson, D. S. (1988). Determination of microbial biomass carbon and nitrogen in soil. *Advances in nutrient cycling in agricultural ecosystems*.
- Jolivet, C., Arrouays, D., & Boulonne, L. (2008). Le Réseau de mesures de la Qualité des sols de France (RmQs) Etat d ' avancement et premiers résultats. *Etude et Gestion Des Sols*, 13, 149–164.
- Jones, M. D. M., Richards, T. A., Hawksworth, D. L., & Bass, D. (2011). Validation and justification of the phylum name *Cryptomycota* phyl. nov. *IMA Fungus*. Retrieved from <http://www.ingentaconnect.com/content/ima/imafung/2011/00000002/00000002/art00015>
- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M. C., Schleifer, K.-H., Pommerening-Röser, A., Koops, H.-P., & Wagner, M. (1998). Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(8), 3042–3051.
- Kaewkla, O., & Franco, C. M. M. (2011). *Pseudonocardia eucalypti* sp. nov., an endophytic actinobacterium with a unique knobby spore surface, isolated from roots of a native Australian eucalyptus tree. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(2011), 742–746. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.022327-0>
- Kamekura, M. (1998). Diversity of extremely halophilic bacteria. *Extremophiles*, 2(3), 289–295. <http://doi.org/10.1007/s007920050071>
- Kandeler, F., Kampichler, C., & Horak, O. (1996). Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biology and Fertility of Soils*, 23(3), 299–306. <http://doi.org/10.1007/BF00335958>
- Kanová, H., Carre, J., Vránová, V., Rejsek, K., & Formánek, P. (2010). Organic compounds in root exudates of *Miscanthus x Giganteus* Greef et Deu and limitation of microorganisms in its rhizosphere by nutrients. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*.
- Karlen, D. L., Mausbach, M. J., Doran, J. W., Cline, R. G., Harris, R. F., & Schuman, G. E. (1997). Soil Quality: A Concept, Definition, and Framework for Evaluation (A Guest Editorial). *Soil Science Society of America Journal*, 61(1), 4. <http://doi.org/10.2136/sssaj1997.03615995006100010001x>
- Kaymak, H. C. (2011). Potential of PGPR in agricultural innovations. *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*, 45–79.
- Kennedy, a C., Smith, K. L., & Publishers, K. A. (1995). Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil*, 170(1), 75–86. <http://doi.org/10.1007/BF02183056>
- Killham, K. (1994). *Soil ecology*.
- Kivistö, A. T., & Karp, M. T. (2011). Halophilic anaerobic fermentative bacteria. *Journal of Biotechnology*, 152(4), 114–124. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.08.014>

- Koops, H. P., & Pommerening-Röser, A. (2001). Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiology Ecology*, 37(1), 1–9. [http://doi.org/10.1016/S0168-6496\(01\)00137-4](http://doi.org/10.1016/S0168-6496(01)00137-4)
- Kowalchuk, G. A., Buma, D. S., de Boer, W., Klinkhamer, P. G. L., & van Veen, J. A. (2002). Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *International Journal of General and Molecular Microbiology*, 81, 509–520. <http://doi.org/10.1023/A:1020565523615>
- Kuperman, R. G., & Carreiro, M. M. (1997). Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*, 29(2), 179–190. [http://doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00297-0](http://doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00297-0)
- Kuramae, E. E., Yergeau, E., Wong, L. C., Pijl, A. S., Veen, J. A., & Kowalchuk, G. A. (2012). Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(1), 12–24. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01192.x>
- Kushwaha, C. P., Tripathi, S. K., & Singh, K. P. (2000). Variations in soil microbial biomass and N availability due to residue and tillage management in a dryland rice agroecosystem. *Soil and Tillage Research*, 56(3–4), 153–166. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0167-1987\(00\)00135-5](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0167-1987(00)00135-5)
- Kushwaha, C. P., Tripathi, S. K., & Singh, K. P. (2001). Soil organic matter and water-stable aggregates under different tillage and residue conditions in a tropical dryland agroecosystem. *Applied Soil Ecology*, 16, 229–241. [http://doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00121-9](http://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00121-9)
- Lal, R., & Kimble, J. M. (1997). Conservation tillage for carbon sequestration. *Nutrient Cycling in Agroecosystem*, 49, 243–253. <http://doi.org/Doi 10.1023/A:1009794514742>
- Lamy, I., van Oort, F., Dere, C., & Baize, D. (2006). Use of major- and trace-element correlations to assess metal migration in sandy Luvisols irrigated with wastewater. *European Journal of Soil Science*, 57(5), 731–740. <http://doi.org/Doi 10.1111/J.1365-2389.2005.00765.X>
- Lauber, C. L., 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(15), 5111–5120. <http://doi.org/10.1128/AEM.00335-09>
- Lauber, C. L., Strickland, M. S., Bradford, M. A., & Fierer, N. (2008). The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(9), 2407–2415. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.05.021>
- Lavelle, P. (1996). Diversity of Soil Fauna and Ecosystem Function. *Biology International*, 33(33), 3–16. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Diversity+of+Soil+Fauna+and+Ecosystem+Function#0>
- Lavelle, P., Decaëns, T., Aubert, M., Barot, S., Blouin, M., Bureau, F., ... Rossi, J.-P. (2006). Soil invertebrates and ecosystem services. *European Journal of Soil Biology*, 42, S3–S15. <http://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2006.10.002>

- Leckie, S. E., Prescott, C. E., Grayston, S. J., Neufeld, J. D., & Mohn, W. W. (2004). Comparison of chloroform fumigation-extraction, phospholipid fatty acid, and DNA methods to determine microbial biomass in forest humus. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(3), 529–532. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2003.10.014>
- Leininger, S., Urich, T., Schlöter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G. W., ... Schleper, C. (2006). Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 442(August), 806–809. <http://doi.org/10.1038/nature04983>
- Lejon, D. P. H., Nowak, V., Bouko, S., Pascual, N., Mougél, C., Martins, J. M. F., & Ranjard, L. (2007). Fingerprinting and diversity of bacterial copA genes in response to soil types, soil organic status and copper contamination. *FEMS Microbiology Ecology*, 61(3), 424–437. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00365.x>
- Lewandowski, I., & Heinz, a. (2003). Delayed harvest of miscanthus - Influences on biomass quantity and quality and environmental impacts of energy production. *European Journal of Agronomy*, 19(1), 45–63. [http://doi.org/10.1016/S1161-0301\(02\)00018-7](http://doi.org/10.1016/S1161-0301(02)00018-7)
- Liang, C., Jesus, E. da C., Duncan, D. S., Jackson, R. D., Tiedje, J. M., & Balser, T. C. (2012). Soil microbial communities under model biofuel cropping systems in southern Wisconsin, USA: Impact of crop species and soil properties. *Applied Soil Ecology*, 54, 24–31. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.11.015>
- Lienhard, P., Terrat, S., Prévost-Bouré, N. C., Nowak, V., Régnier, T., Sayphoummie, S., ... Ranjard, L. (2014). Pyrosequencing evidences the impact of cropping on soil bacterial and fungal diversity in Laos tropical grassland. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(2), 525–533. <http://doi.org/10.1007/s13593-013-0162-9>
- Lienhard, P., Terrat, S., Mathieu, O., Levêque, J., Chemidlin Prévost-Bouré, N., Nowak, V., ... Maron, P. A. (2013). Soil microbial diversity and C turnover modified by tillage and cropping in Laos tropical grassland. *Environmental Chemistry Letters*, 11(4), 391–398. <http://doi.org/10.1007/s10311-013-0420-8>
- Lienhard, P., Tivet, F., Chabanne, A., Dequiedt, S., Lelièvre, M., Sayphoummie, S., ... Ranjard, L. (2013). No-till and cover crops shift soil microbial abundance and diversity in Laos tropical grasslands. *Agronomy for Sustainable Development*, 33(2), 375–384. <http://doi.org/10.1007/s13593-012-0099-4>
- Linden, D. R., Hendrix, P. F., Coleman, D. C., & Vliet, P. C. J. Van. (1994). Quality1, (35).
- Linderman, R. G., & Hendrix, J. W. (1982). Evaluation of plant response to colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi.
- Liu, Y., Johnson, N. C., Mao, L., Shi, G., Jiang, S., Ma, X., ... Feng, H. (2015). Phylogenetic structure of arbuscular mycorrhizal community shifts in response to increasing soil fertility. *Soil Biology and Biochemistry*, 89, 196–205. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.07.007>
- Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E. R. B., Taghavi, S., Mezgeay, M., & der Lelie, D. van. (2002). Endophytic Bacteria and Their Potential Applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(6), 583–606. <http://doi.org/10.1080/0735-260291044377>

- Lozupone, C., & Knight, R. (2005). UniFrac : a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8228–8235. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228>
- MacArthur, R. H., & Wilson, E. O. (1967). *The theory of island biogeography* (Vol. 1).
- Mace, G. M., Norris, K., & Fitter, A. H. (2012). Biodiversity and ecosystem services: A multilayered relationship. *Trends in Ecology and Evolution*, 27(1), 19–25. <http://doi.org/10.1016/j.tree.2011.08.006>
- Mamba, B. B. (2009). Indigenous microorganism strains as bio-extractants of Ca, Fe, and Mg from metallurgical and mine drainages, 93–100.
- Mao, Y., Yannarell, A. C., Davis, S. C., & Mackie, R. I. (2013). Impact of different bioenergy crops on N-cycling bacterial and archaeal communities in soil. *Environmental Microbiology*, 15(3), 928–942. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02844.x>
- Markert, B. (2007). Definitions and principles for bioindication and biomonitoring of trace metals in the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 21(SUPPL. 1), 77–82. <http://doi.org/10.1016/j.jtemb.2006.12.004>
- Maron, P.-A., Mougél, C., & Ranjard, L. (2011). Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. *Comptes Rendus Biologies*, 334(5-6), 403–11. <http://doi.org/10.1016/j.crv.2010.12.003>
- Maron, P.-A., Ranjard, L., Mougél, C., & Lemanceau, P. (2007). Metaproteomics: A New Approach for Studying Functional Microbial Ecology. *Microbial Ecology*, 53(3), 486–493. <http://doi.org/10.1007/s00248-006-9196-8>
- Marstorp, H., Guan, X., & Gong, P. (2000). Relationship between dsDNA, chloroform labile C and ergosterol in soils of different organic matter contents and pH. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(6), 879–882. [http://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00210-2](http://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00210-2)
- Martínez, M., López-Solanilla, E., Rodríguez-Palenzuela, P., Carbonero, P., & Díaz, I. (2003). Inhibition of plant-pathogenic fungi by the barley cystatin Hv-CPI (gene Icy) is not associated with its cysteine-proteinase inhibitory properties. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*, 16(10), 876–883. <http://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.10.876>
- Martin-Laurent, F., Cornet, L., Ranjard, L., López-Gutiérrez, J.-C., Philippot, L., Schwartz, C., ... Soulas, G. (2004). Estimation of atrazine-degrading genetic potential and activity in three French agricultural soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 48(3), 425–435. <http://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.03.008>
- Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Soulas, G., & Catroux, G. (2001). DNA Extraction from Soils : Old Bias for New Microbial Diversity Analysis Methods DNA Extraction from Soils: Old Bias for New Microbial Diversity Analysis Methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2354–2359. <http://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2354>

- McGuire, K. L., Payne, S. G., Palmer, M. I., Gillikin, C. M., Keefe, D., Kim, S. J., ... Fierer, N. (2013). Digging the New York City Skyline: Soil Fungal Communities in Green Roofs and City Parks. *PLoS ONE*, 8(3), e58020. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0058020>
- Mehnaz, S., & Lazarovits, G. (2006). Inoculation Effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on Corn Plant Growth Under Greenhouse Conditions. *Microbial Ecology*, 51(3), 326–335. <http://doi.org/10.1007/s00248-006-9039-7>
- Merlin, C., Devers, M., Crouzet, O., Heraud, C., Steinberg, C., Mougin, C., & Martin-Laurent, F. (2014). Characterization of chlordecone-tolerant fungal populations isolated from long-term polluted tropical volcanic soil in the French West Indies. *Environmental Science and Pollution Research International*, 21(7), 4914–27. <http://doi.org/10.1007/s11356-013-1971-8>
- Metting, B. (1981). The systematics and ecology of soil algae. *The Botanical Review*, 47(2), 195–312.
- Mikanová, O., Kuba't, J., & Nova'kova, J. (2002). Some microbial characteristics and enzymatic activities in soils polluted with heavy metals. *World Congress of Soil Science Bangkok*, 792, 1–7.
- Miransari, M. (2011). Hyperaccumulators, arbuscular mycorrhizal fungi and stress of heavy metals. *Biotechnology Advances*, 29(6), 645–653. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.006>
- Moorman, T. B. (1989). A review of pesticide effects on microorganisms and microbial processes related to soil fertility. *Journal of Production Agriculture*, 2(1), 14–23.
- Morita, R. Y. (1975). Psychrophilic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 39(2), 144–167. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(59\)91597-1](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(59)91597-1)
- Mougin, C., Chaplain, V., Rama-Mercier, R., Sohier, L., Sigoillot, J.-C., & Asther, M. (1996). Utilisation De Champignons Filamenteux Pour La Dépollution De Sols Pollués Par Des Polluants Organiques. *Sciences et Techniques*, 4, 20–22.
- Mougin, C., Jolival, C., Briozzo, P., & Madzak, C. (2003). Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. *Environmental Chemistry Letters*, 1(2), 145–148. <http://doi.org/10.1007/s10311-003-0024-9>
- Mougin, C., Laugero, C., Asther, M., Dubroca, J., Frasse, P., & Asther, M. (1994). Biotransformation of the herbicide atrazine by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(2), 705–708.
- Mulder, C., Schouten, A. J., Hund-Rinke, K., & Breure, A. M. (2005). The use of nematodes in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62(2), 278–289. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.028>
- Mummey, D., Holben, W., Six, J., & Stahl, P. (2006). Spatial stratification of soil bacterial populations in aggregates of diverse soils. *Microbial Ecology*, 51(3), 404–411.
- Musy, A., & Soutter, M. (1991). *Physique du sol*.

- Muyzer, G., & Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(1), 127–41. <http://doi.org/10.1023/A:1000669317571>
- Nacke, H., Thürmer, A., Wollherr, A., Will, C., Hodac, L., Herold, N., ... Daniel, R. (2011). Pyrosequencing-Based Assessment of Bacterial Community Structure Along Different Management Types in German Forest and Grassland Soils. *PLoS ONE*, 6(2), e17000. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0017000>
- Nahmani, J., & Lavelle, P. (2002). Effects of heavy metal pollution on soil macrofauna in a grassland of Northern France. *European Journal of Soil Biology*, 38(3-4), 297–300. [http://doi.org/10.1016/S1164-5563\(02\)01169-X](http://doi.org/10.1016/S1164-5563(02)01169-X)
- Nakajima, A., & Sakaguchi, T. (1986). *Applied Microbiology Biotechnology*.
- Nakatsu, C. H. (2007). Soil Microbial Community Analysis Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Soil Science Society of America Journal*, 71(2), 562. <http://doi.org/10.2136/sssaj2006.0080>
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Landi, L., Pietramellara, G., & Renella, G. (2003). Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54(4), 655–670. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2389.2003.00556.x>
- Nicol, G. W., Tscherko, D., Chang, L., Hammesfahr, U., & Prosser, J. I. (2006). Crenarchaeal community assembly and microdiversity in developing soils at two sites associated with deglaciation. *Environmental Microbiology*, 8(8), 1382–1393. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01031.x>
- Nicolardot, B., Bouziri, L., Bastian, F., & Ranjard, L. (2007). A microcosm experiment to evaluate the influence of location and quality of plant residues on residue decomposition and genetic structure of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(7), 1631–1644. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.01.012>
- Nielsen, M. N., & Winding, A. (2002). *Microorganisms as indicators of soil health. NERI technical report*. Retrieved from <http://www.dmu.dk>
- Oades, J. M. (1993). The role of biology in the formation, stabilization and degradation of soil structure. *Geoderma*, 56(1-4), 377–400. [http://doi.org/10.1016/0016-7061\(93\)90123-3](http://doi.org/10.1016/0016-7061(93)90123-3)
- Ohtaka, N., & Narisawa, K. (2008). Molecular characterization and endophytic nature of the root-associated fungus *Meliniomyces variabilis* (LtVB3). *Journal of General Plant Pathology*, 74(1), 24–31. <http://doi.org/10.1007/s10327-007-0046-4>
- Okon, Y., & Labandera-Gonzalez, C. A. (1994). Agronomic applications of azospirillum: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(12), 1591–1601. [http://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90311-5](http://doi.org/10.1016/0038-0717(94)90311-5)
- Ollivier, J., Wanat, N., Austruy, A., Hitmi, A., Joussein, E., Welzl, G., ... Schlöter, M. (2012). Abundance and Diversity of Ammonia-Oxidizing Prokaryotes in the Root–Rhizosphere Complex

- of *Miscanthus × giganteus* Grown in Heavy Metal-Contaminated Soils. *Microbial Ecology*, 64(4), 1038–1046. <http://doi.org/10.1007/s00248-012-0078-y>
- Øvreås, L., & Torsvik, V. (1998). Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microbial Ecology*, 36(3-4), 303–315.
- Pankhurst, C., Doube, B. M., & Gupta, V. V. S. R. (1997). Biological indicators of soil health.
- Papa, S., Bartoli, G., Pellegrino, A., & Fioretto, A. (2010). Microbial activities and trace element contents in an urban soil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 165(1-4), 193–203. <http://doi.org/10.1007/s10661-009-0938-1>
- Parrish, D. J., & Fike, J. H. (2005). The Biology and Agronomy of Switchgrass for Biofuels. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24(5-6), 423–459. <http://doi.org/10.1080/07352680500316433>
- Pascual, N., Cécillon, L., Mathieu, O., Hénault, C., Sarr, A., Lévêque, J., ... Maron, P.-A. (2010). In Situ Dynamics of Microbial Communities during Decomposition of Wheat, Rape, and Alfalfa Residues. *Microbial Ecology*, 60(4), 816–828. <http://doi.org/10.1007/s00248-010-9705-7>
- Pauget, B. (2012). *Détermination des facteurs du sol modulant la biodisponibilité et l'accumulation des métaux pour l'escargot (cantareus aspersus)*.
- Paul, E. A. (2014). *Soil microbiology, ecology and biochemistry*.
- Paul, E. A., Name, F., Training, O., Training, P., Darin, C., Training, R. O., ... Co-investigator, N. (2014). *Soil Microbiology and Biochemistry. Igarss 2014*. <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Pavel, P.-B., Puschenreiter, M., Wenzel, W. W., Diacu, E., & Barbu, C. H. (2014). Aided phytostabilization using *Miscanthus sinensis*×*giganteus* on heavy metal-contaminated soils. *Science of The Total Environment*, 479-480, 125–131. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.097>
- Pelosi, C., Bertrand, M., Thénard, J., & Mougin, C. (2015). Earthworms in a 15 years agricultural trial. *Applied Soil Ecology*, 88, 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.12.004>
- Pennanen, T., Frostegard, a, Fritze, H., & Baath, E. (1996). Phospholipid Fatty Acid Composition and Heavy Metal Tolerance of Soil Microbial Communities along Two Heavy Metal-Polluted Gradients in Coniferous Forests. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 420–428.
- Pérès, G., Vandenbulcke, F., Guernion, M., Hedde, M., Beguiristain, T., Douay, F., ... Cluzeau, D. (2011). Earthworm indicators as tools for soil monitoring, characterization and risk assessment. An example from the national Bioindicator programme (France). *Pedobiologia*, 54, S77–S87. <http://doi.org/10.1016/j.pedobi.2011.09.015>
- Petric, I., Philippot, L., Abbate, C., Bispo, A., Chesnot, T., Hallin, S., ... Martin-Laurent, F. (2011). Inter-laboratory evaluation of the ISO standard 11063 “Soil quality — Method to directly extract DNA from soil samples.” *Journal of Microbiological Methods*, 84(3), 454–460. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.01.016>

- Philippot, L., Abbate, C., Bispo, A., Chesnot, T., Hallin, S., Lemanceau, P., ... Martin-Laurent, F. (2010). Soil microbial diversity: an ISO standard for soil DNA extraction. *Journal of Soils and Sediments*, 10(7), 1344–1345. <http://doi.org/10.1007/s11368-010-0265-8>
- Philippot, L., Spor, A., Hénault, C., Bru, D., Bizouard, F., Jones, C. M., ... Maron, P.-A. (2013). Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. *The ISME Journal*, 7(8), 1609–1619. <http://doi.org/10.1038/ismej.2013.34>
- Pidlisnyuk, V., Stefanovska, T., Lewis, E. E., Erickson, L. E., & Davis, L. C. (2014). Miscanthus as a Productive Biofuel Crop for Phytoremediation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 33(1), 1–19. <http://doi.org/10.1080/07352689.2014.847616>
- Plassart, P., Terrat, S., Thomson, B., Griffiths, R., Dequiedt, S., Lelievre, M., ... Ranjard, L. (2012). Evaluation of the ISO Standard 11063 DNA Extraction Procedure for Assessing Soil Microbial Abundance and Community Structure. *PLoS ONE*, 7(9), e44279. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0044279>
- Postma, J., Schilder, M. T., & van Hoof, R. A. (2011). Indigenous Populations of Three Closely Related *Lysobacter* spp. in Agricultural Soils Using Real-Time PCR. *Microbial Ecology*, 62(4), 948–958. <http://doi.org/10.1007/s00248-011-9847-2>
- Price, L., Bullard, M., Lyons, H., Anthony, S., & Nixon, P. (2004). Identifying the yield potential of *Miscanthus x giganteus*: an assessment of the spatial and temporal variability of *M. x giganteus* biomass productivity across England and Wales. *Biomass and Bioenergy*, 26(1), 3–13. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0961-9534\(03\)00062-X](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0961-9534(03)00062-X)
- Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLoS ONE*, 5(3), e9490. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
- Pulleman, M., Creamer, R., Hamer, U., Helder, J., Pelosi, C., Pérès, G., & Rutgers, M. (2012). Soil biodiversity, biological indicators and soil ecosystem services—an overview of European approaches. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 4(5), 529–538. <http://doi.org/10.1016/j.cosust.2012.10.009>
- Purakayastha, T. J., Smith, J. L., & Huggins, D. R. (2009). Microbial biomass and N cycling under native prairie, conservation reserve and no-tillage in Palouse soils. *Geoderma*, 152(3–4), 283–289. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2009.06.013>
- Qiu, M., Zhang, R., Xue, C., Zhang, S., Li, S., Zhang, N., & Shen, Q. (2012). Application of bio-organic fertilizer can control *Fusarium* wilt of cucumber plants by regulating microbial community of rhizosphere soil. *Biology and Fertility of Soils*, 48(7), 807–816. <http://doi.org/10.1007/s00374-012-0675-4>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., ... Glockner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590–D596. <http://doi.org/10.1093/nar/gks1219>

- Rajendhran, J., & Gunasekaran, P. (2008). Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. *Biotechnology Advances*, 26(6), 576–590. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.08.002>
- Rajkumar, M., Ae, N., & Freitas, H. (2009). Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. *Chemosphere*, 77(2), 153–160. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.06.047>
- Ranjard, L., Dequiedt, S., Jolivet, C., Saby, N. P. a, Thioulouse, J., Harmand, J., ... Lemanceau, P. (2009). Biogeography of soil microbial communities: A review and a description of the ongoing French national initiative. *Sustainable Agriculture*, 2, 857–865. http://doi.org/10.1007/978-94-007-0394-0_37
- Ranjard, L., Lejon, D. P. H., Mougél, C., Schehrer, L., Merdinoglu, D., & Chaussod, R. (2003). Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 5(11), 1111–1120. <http://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00521.x>
- Ranjard, L., Lignier, L., & Chaussod, R. (2006). Cumulative Effects of Short-Term Polymetal Contamination on Soil Bacterial Community Structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (2), 1684–1687. <http://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1684-1687.2006>
- Ranjard, L., Poly, F., Combrisson, J., Richaume, a, Gourbiere, F., Thioulouse, J., & Nazaret, S. (2000). Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA. *Microbial Ecology*, 33(4), 263–272. <http://doi.org/10.1007/s002480000032>
- Ranjard, L., & Richaume, A. (2001). Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Research in Microbiology*, 152(8), 707–716. [http://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01251-7](http://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01251-7)
- Remon, E., Bouchardon, J. L., Joly, J., Cornier, B., Faure, O., Remon, E., ... Accumulation, O. F. (n.d.). ements m ´ etalliques sur les populations v ´ eg ´ etales spontan ´ ees de trois crassiers m ´ etallurgiques : peut-on utiliser les plantes comme bioindicateurs ? To cite this version :
- Riah, W., Laval, K., Laroche-Ajzenberg, E., Mougin, C., Latour, X., & Trinsoutrot-Gattin, I. (2014). Effects of pesticides on soil enzymes: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 1–17. <http://doi.org/10.1007/s10311-014-0458-2>
- Rillig, M. C., & Mummey, D. L. (2006). Mycorrhizas and soil structure. *The New Phytologist*, 171(1), 41–53. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01750.x>
- Ritz, K., Black, H. I. J., Campbell, C. D., Harris, J. A., & Wood, C. (2009). Selecting biological indicators for monitoring soils: A framework for balancing scientific and technical opinion to assist policy development. *Ecological Indicators*, 9(6), 1212–1221. <http://doi.org/10.1016/j.ecolind.2009.02.009>
- Roberson, E. B., Sarig, S., Shennan, C., & Firestone, M. K. (1995). Nutritional Management of Microbial Polysaccharide Production and Aggregation in an Agricultural Soil. *Soil Science Society of America Journal*, 59(6), 1587–1594. Retrieved from <https://dl.sciencesocieties.org/publications/sssaj/abstracts/59/6/SS0590061587>

- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4-5), 319–339. [http://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](http://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2)
- Roesch, L. F. W., Fulthorpe, R. R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A. K. M., Kent, A. D., ... Triplett, E. W. (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME Journal*, 1(4), 283–90. <http://doi.org/10.1038/ismej.2007.53>
- Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., & Thompson, F. (2014). *The Prokaryotes: Actinobacteria*.
- Rosenzweig, N., Bradeen, J. M., Tu, Z. J., McKay, S. J., & Kinkel, L. L. (2013). Rhizosphere bacterial communities associated with long-lived perennial prairie plants vary in diversity, composition, and structure. *Canadian Journal of Microbiology*, 59(7), 494–502. <http://doi.org/10.1139/cjm-2012-0661>
- Rousk, J., & Bååth, E. (2007). Fungal and bacterial growth in soil with plant materials of different C/N ratios. *FEMS Microbiology Ecology*, 62(3), 258–267. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00398.x>
- Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P. C., Lauber, C. L., Lozupone, C., Caporaso, J. G., ... Fierer, N. (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *Isme Journal*, 4, 1340–1351. <http://doi.org/10.1038/ismej.2010.58>
- Russell, N. (1990). A comparison of thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 75(2-3), 171–182. [http://doi.org/10.1016/0378-1097\(90\)90530-4](http://doi.org/10.1016/0378-1097(90)90530-4)
- Salinas-García, J. R., Velázquez-García, J. d. J., Gallardo-Valdez, M., Díaz-Mederos, P., Caballero-Hernández, F., Tapia-Vargas, L. M., & Rosales-Robles, E. (2002). Tillage effects on microbial biomass and nutrient distribution in soils under rain-fed corn production in central-western Mexico. *Soil and Tillage Research*, 66(2), 143–152. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0167-1987\(02\)00022-3](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0167-1987(02)00022-3)
- Salmond G. (1994). Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 181–200.
- Schimel, J. (2003). The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil: a theoretical model. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(4), 549–563. [http://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00015-4](http://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00015-4)
- Schlöter, M., Dilly, O., & Munch, J. C. (2003). Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 98(1-3), 255–262. [http://doi.org/10.1016/S0167-8809\(03\)00085-9](http://doi.org/10.1016/S0167-8809(03)00085-9)
- Schmidt O, Wei DS, Tang TKH, L. W. (2015). Bamboo and fungi, (September), 0–14.
- Schwarz, W. H. (2001). The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(5-6), 634–649. <http://doi.org/10.1007/s002530100710>

- Selosse M-A, Strullu-Derrien C, Martin F, Kamoun S, K. P. (2015). Meetings Plants , fungi and oomycetes : a 400-million year affair that shapes the biosphere. *New Phytologist*, 501–506. <http://doi.org/10.1111/nph.13371>
- Shange, R. S., Ankumah, R. O., Ibekwe, A. M., Zabawa, R., & Dowd, S. E. (2012). Distinct Soil Bacterial Communities Revealed under a Diversely Managed Agroecosystem. *PLoS ONE*, 7(7), e40338. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0040338>
- Shannon, C. E., & Weaver, W. (1949). 77ie mathematical theory of communication.
- Sharma, S. K., Ramesh, A., Sharma, M. P., Joshi, O. P., Govaerts, B., Steenwerth, K. L., & Karlen, D. L. (2011). *Biodiversity, Biofuels, Agroforestry and Conservation Agriculture* (Vol. 5). <http://doi.org/10.1007/978-90-481-9513-8>
- Singh, B. K., Bardgett, R. D., Smith, P., & Reay, D. S. (2010). Microorganisms and climate change: terrestrial feedbacks and mitigation options. *Nat Rev Micro*, 8(11), 779–790. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2439>
- Six, J., Paustian, K., Elliott, E. T., & Combrink, C. (2000). Soil structure and organic matter : I. Distribution of aggregate-size classes. *Soil Science Society of America Journal*, 64, 681–689. <http://doi.org/10.2136/sssaj2000.642681x>
- Six, J., Feller, C., Denef, K., Ogle, S., Sa, J. C. D. M., & Albrecht, A. (2002). Soil organic matter, biota and aggregation in temperate and tropical soils-Effects of no-tillage. *Agronomie*, 22(7-8), 755–775.
- Smith, K. a., Ball, T., Conen, F., Dobbie, K. E., Massheder, J., & Rey, a. (2003). Exchange of greenhouse gases between soil and atmosphere: Interactions of soil physical factors and biological processes. *European Journal of Soil Science*, 54(4), 779–791. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2389.2003.00567.x>
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). Mycorrhizal symbiosis.
- Soule, T., Anderson, I. J., Johnson, S. L., Bates, S. T., & Garcia-Pichel, F. (2009). Archaeal populations in biological soil crusts from arid lands in North America. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(10), 2069–2074. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.07.023>
- Sparling, G. P., Pankhurst, C., Doube, B. M., & Gupta, V. V. S. R. (1997). Soil microbial biomass, activity and nutrient cycling as indicators of soil health. *Biological Indicators of Soil Health*, 97–109.
- Straub, D., Yang, H., Liu, Y., & Ludewig, U. (2013). Transcriptomic and proteomic comparison of two Miscanthus genotypes: high biomass correlates with investment in primary carbon assimilation and decreased secondary metabolism. *Plant and Soil*, 372(1-2), 151–165. <http://doi.org/10.1007/s11104-013-1693-1>
- Strickland, M. S., & Rousk, J. (2010). Considering fungal:bacterial dominance in soils – Methods, controls, and ecosystem implications. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(9), 1385–1395. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.05.007>

- Suárez-Moreno, Z. R., Caballero-Mellado, J., Coutinho, B. G., Mendonça-Previato, L., James, E. K., & Venturi, V. (2012). Common Features of Environmental and Potentially Beneficial Plant-Associated Burkholderia. *Microbial Ecology*, 63(2), 249–266. <http://doi.org/10.1007/s00248-011-9929-1>
- Sun, B., Hallett, P., Caul, S., Daniell, T., & Hopkins, D. (2011). Distribution of soil carbon and microbial biomass in arable soils under different tillage regimes. *Plant and Soil*, 338(1-2), 17–25. <http://doi.org/10.1007/s11104-010-0459-2>
- Swift, M. J., Izac, A.-M. N., & van Noordwijk, M. (2004). Biodiversity and ecosystem services in agricultural landscapes—are we asking the right questions? *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 104(1), 113–134. <http://doi.org/10.1016/j.agee.2004.01.013>
- Tamtam, F., van Oort, F., Le Bot, B., Dinh, T., Mompelat, S., Chevreuil, M., ... Thiry, M. (2011). Assessing the fate of antibiotic contaminants in metal contaminated soils four years after cessation of long-term waste water irrigation. *The Science of the Total Environment*, 409(3), 540–7. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.10.033>
- Tang, J., Mo, Y., Zhang, J., & Zhang, R. (2011). Influence of biological aggregating agents associated with microbial population on soil aggregate stability. *Applied Soil Ecology*, 47(3), 153–159. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.01.001>
- Tang, C., Sparling, G. P., McLay, C. D. A., & Raphael, C. (1999). Effect of short-term legume residue decomposition on soil acidity. *Australian Journal of Soil Research*, 37(3), 561–573.
- Tardy, V., Chabbi, A., Charrier, X., de Berranger, C., Reignier, T., Dequiedt, S., ... Maron, P.-A. (2015). Land Use History Shifts In Situ Fungal and Bacterial Successions following Wheat Straw Input into the Soil. *Plos One*, 10(6), e0130672. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0130672>
- Tardy, V., Mathieu, O., Lévêque, J., Terrat, S., Chabbi, A., Lemanceau, P., ... & Maron, P. A. (2014). Stability of soil microbial structure and activity depends on microbial diversity. *Environmental Microbiology Reports*, 6(2), 173–183.
- Tebrügge, F., Düring, R. -a., Du, R., & Tebru, F. (1999). Reducing tillage intensity - A review of results from a long-term study in Germany. *Soil and Tillage Research*, 53(1), 15–28. [http://doi.org/10.1016/S0167-1987\(99\)00073-2](http://doi.org/10.1016/S0167-1987(99)00073-2)
- Técher, D., Laval-Gilly, P., Henry, S., Bennasroune, A., Formanek, P., Martinez-Chois, C., ... Falla, J. (2011). Contribution of Miscanthus x giganteus root exudates to the biostimulation of PAH degradation: An in vitro study. *Science of The Total Environment*, 409(20), 4489–4495. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.06.049>
- Terrat, S., Christen, R., Dequiedt, S., Lelièvre, M., Nowak, V., Regnier, T., ... Ranjard, L. (2012). Molecular biomass and MetaTaxogenomic assessment of soil microbial communities as influenced by soil DNA extraction procedure. *Microbial Biotechnology*, 5(1), 135–141. <http://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00307.x>
- Terrat, S., Dequiedt, S., Horrigue, W., Lelievre, M., Cruaud, C., Saby, N. P. A., ... Chemidlin Prévost-Bouré, N. (2015). Improving soil bacterial taxa–area relationships assessment using DNA meta-barcoding. *Heredity*, 114(5), 468–475. <http://doi.org/10.1038/hdy.2014.91>

- Terrat, S., Plassart, P., Bourgeois, E., Ferreira, S., Dequiedt, S., Adele-Dit-De-Renseville, N., ... Ranjard, L. (2015). Meta-barcoded evaluation of the ISO standard 11063 DNA extraction procedure to characterize soil bacterial and fungal community diversity and composition. *Microbial Biotechnology*, 8(1), 131–142. <http://doi.org/10.1111/1751-7915.12162>
- Thies, J. E. (2007). Soil Microbial Community Analysis using Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Soil Science Society of America Journal*, 71(2), 579. <http://doi.org/10.2136/sssaj2006.0318>
- Tiedje, J. M., Asuming-Brempong, S., Nüsslein, K., Marsh, T. L., & Flynn, S. J. (1999). Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology*, 13(2), 109–122. [http://doi.org/10.1016/S0929-1393\(99\)00026-8](http://doi.org/10.1016/S0929-1393(99)00026-8)
- Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R., & Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418(6898), 671–7. <http://doi.org/10.1038/nature01014>
- Torsvik, V., & Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5(3), 240–245. [http://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00324-7](http://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00324-7)
- Torsvik, V., Sørheim, R., & Goksøyr, J. (1996). Total bacterial diversity in soil and sediment communities—a review. *Journal of Industrial Microbiology*, 17(3-4), 170–178.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, a., & Itävaara, M. (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: A review. *Bioresource Technology*, 72, 169–183. [http://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00104-2](http://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00104-2)
- Turbé, A., De Toni, A., Benito, P., Lavelle, P., Lavelle, P., Camacho, N. R., ... & Mudgal, S. (2010). Soil biodiversity: functions, threats and tools for policy makers.
- Turco, R. F., Kennedy, a C., & Jawson, M. D. (1994). Microbial Indicators of Soil Quality. *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*, 1916(35), 73–90.
- Van Der Heijden, M. G. A., Bakker, R., Verwaal, J., Scheublin, T. R., Rutten, M., Van Logtestijn, R., & Staehelin, C. (2006). Symbiotic bacteria as a determinant of plant community structure and plant productivity in dune grassland. *FEMS Microbiology Ecology*, 56(2), 178–187. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00086.x>
- Van Elsas, J. D., Garbeva, P., & Salles, J. (2002). Effects of agronomical measures on the microbial diversity of soils as related to the suppression of soil-borne plant pathogens. *Biodegradation*, 13, 29–40. <http://doi.org/10.1023/A:1016393915414>
- van Groenigen, K. J., Bloem, J., Bååth, E., Boeckx, P., Rousk, J., Bodé, S., ... Jones, M. B. (2010). Abundance, production and stabilization of microbial biomass under conventional and reduced tillage. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(1), 48–55. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.09.023>
- van Oort, F., Jongmans, A. G., Lamy, I., Baize, D., & Chevallier, P. (2008). Impacts of long-term waste-water irrigation on the development of sandy Luvisols: consequences for metal pollutant distributions. *European Journal of Soil Science*, 59(5), 925–938. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2008.01047.x>

- Vance, E. D., Brookes, P. C., & Jenkinson, D. S. (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, 19(6), 703–707. [http://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](http://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6)
- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., ... Mench, M. (2009). Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental Science and Pollution Research*, 16(7), 765–794. <http://doi.org/10.1007/s11356-009-0213-6>
- Verbruggen, E., Rölting, W. F. M., Gamper, H. a., Kowalchuk, G. a., Verhoef, H. a., & van der Heijden, M. G. a. (2010). Positive effects of organic farming on below-ground mutualists: Large-scale comparison of mycorrhizal fungal communities in agricultural soils. *New Phytologist*, 186(4), 968–979. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03230.x>
- Vian, J. F., Peigne, J., Chaussod, R., & Roger-Estrade, J. (2009). Effects of four tillage systems on soil structure and soil microbial biomass in organic farming. *Soil Use and Management*, 25(1), 1–10. <http://doi.org/10.1111/j.1475-2743.2008.00176.x>
- Walker, C., Vestberg, M., Demircik, F., Stockinger, H., Saito, M., Sawaki, H., ... Schüßler, A. (2007). Molecular phylogeny and new taxa in the Archaeosporales (Glomeromycota): *Ambispora fennica* gen. sp. nov., *Ambisporaceae* fam. nov., and emendation of *Archaeospora* and *Archaeosporaceae*. *Mycological Research*, 111(2), 137–153. <http://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.11.008>
- Wang, Q., Bai, Y., Gao, H., He, J., Chen, H., Chesney, R. C., ... Li, H. (2008). Soil chemical properties and microbial biomass after 16 years of no-tillage farming on the Loess Plateau, China. *Geoderma*, 144(3–4), 502–508. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2008.01.003>
- Wardle, D. a, Bardgett, R. D., Klironomos, J. N., Setälä, H., van der Putten, W. H., & Wall, D. H. (2004). Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5677), 1629–1633. <http://doi.org/10.1126/science.1094875>
- Wardle, D. A., Yeates, G. W., Nicholson, K. S., Bonner, K. I., & Watson, R. N. (1999). Response of soil microbial biomass dynamics, activity and plant litter decomposition to agricultural intensification over a seven-year period. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(12), 1707–1720. [http://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00090-5](http://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00090-5)
- Warkentin, B. P. (1995). The changing concept of soil quality. *Journal of Soil and Water Conservation*, 50(3), 226–228.
- Watson C.A.*, Atkinson, D., Gosling, P., Jackson, L. R., & Rayns, F. W. (2002). Managing soil fertility in organic farming systems. *Soil Use and Management*, 18(3), 239–247. <http://doi.org/10.1079/SUM2002131>
- Webster, R., & Oliver, M. A. (2010). *Geostatistics for environmental scientists*.
- Widmer, F., Rasche, F., Hartmann, M., & Fliessbach, A. (2006). Community structures and substrate utilization of bacteria in soils from organic and conventional farming systems of the DOK long-

- term field experiment. *Applied Soil Ecology*, 33(3), 294–307. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.09.007>
- Will, C., Thurmer, A., Wollherr, A., Nacke, H., Herold, N., Schrumpf, M., ... Daniel, R. (2010). Horizon-Specific Bacterial Community Composition of German Grassland Soils, as Revealed by Pyrosequencing-Based Analysis of 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(20), 6751–6759. <http://doi.org/10.1128/AEM.01063-10>
- Wong, M. H. (2003). Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere*, 50(6), 775–780. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00232-1](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00232-1)
- Wright, A. L., Hons, F. M., & Matocha Jr., J. E. (2005). Tillage impacts on microbial biomass and soil carbon and nitrogen dynamics of corn and cotton rotations. *Applied Soil Ecology*, 29(1), 85–92. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2004.09.006>
- Yang, W. W., & Ponce, A. (2011). Validation of a Clostridium endospore viability assay and analysis of greenland ices and atacama desert soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(7), 2352–2358. <http://doi.org/10.1128/AEM.01966-10>
- Yao, H., He, Z., Wilson, M., & Campbell, C. (2000). Microbial Biomass and Community Structure in a Sequence of Soils with Increasing Fertility and Changing Land Use. *Microbial Ecology*, 40(3), 223–237. <http://doi.org/10.1007/s002480000053>
- Yarwood, S. a., Bottomley, P. J., & Myrold, D. D. (2010). Soil Microbial Communities Associated with Douglas-fir and Red Alder Stands at High- and Low-Productivity Forest Sites in Oregon, USA. *Microbial Ecology*, 60, 606–617. <http://doi.org/10.1007/s00248-010-9675-9>
- Yarwood, S. a., Myrold, D. D., & Högborg, M. N. (2009). Termination of belowground C allocation by trees alters soil fungal and bacterial communities in a boreal forest. *FEMS Microbiology Ecology*, 70(1), 151–162. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00733.x>
- Zeikus, J. G. (1979). Thermophilic bacteria: Ecology, physiology and technology. *Enzyme and Microbial Technology*, 1(4), 243–252. [http://doi.org/10.1016/0141-0229\(79\)90043-7](http://doi.org/10.1016/0141-0229(79)90043-7)
- Zelles, L. (1999). Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: A review. *Biology and Fertility of Soils*, 29(2), 111–129. <http://doi.org/10.1007/s003740050533>
- Zhalnina, K., Dias, R., de Quadros, P. D., Davis-Richardson, A., Camargo, F. A. O., Clark, I. M., ... Triplett, E. W. (2015). Soil pH Determines Microbial Diversity and Composition in the Park Grass Experiment. *Microbial Ecology*, 69(2), 395–406. <http://doi.org/10.1007/s00248-014-0530-2>
- Zhou, J., Bruns, M. A., & Tiedje, J. M. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 316–322. <http://doi.org/10.1128/AEM.62.2.316-322.1996> D - NLM: PMC167800 EDAT- 1996/02/01 MHDA- 1996/02/01 00:01 CRDT- 1996/02/01 00:00 PST - ppublish
- Zhou, L., & Ding, M. (2007). Soil microbial characteristics as bioindicators of soil health.

Zimmermann, W. (1990). Degradation of lignin by bacteria. *Journal of Biotechnology*, 13(2-3), 119–130. [http://doi.org/10.1016/0168-1656\(90\)90098-V](http://doi.org/10.1016/0168-1656(90)90098-V)

<http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/memo14territoire.pdf>

<http://www.senat.fr/rap/110-618/110-6181.html>

<http://agriculture.gouv.fr/10-cles-pour-comprendre-lagro-ecologie>

http://www.afes.fr/afes/docs/AFES_d%C3%A9finition_SOL.pdf

<http://www.jymassenet-foret.fr/cours/pedologie/pedo3.pdf>

http://www.brgm.fr/sites/default/files/enjeux_geosciences_16.pdf

http://pierre-armand-roger.fr/publications/pdf/198_bioremed.pdf

<http://www.cbd.int/>

http://www.andra.fr/ope/index.php?option=com_content&view=article&id=45:bioindicateurs-du-sol&catid=47:biodiversite&Itemid=185&lang=fr

<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00670360/document>

<http://454.com/products/technology.asp>

<http://www.agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/primeur292.pdf>

http://www2.dijon.inra.fr/plateforme_genosol/plateforme-genosol

<http://www6.lille.inra.fr/las>

Annexe

Temporal differentiation of soil communities in response to arable crop management strategies

Valérie Coudrain^{1,2,3}, Mickaël Hedde², Matthieu Chauvat³, Pierre-Alain Maron⁴, Emilie Bourgeois⁴, Bruno Mary⁵, Joël Léonard⁵, Flemming Ekelung⁶, Cécile Villenave⁷ and Sylvie Recous¹

¹ INRA, UMR614 FARE, F-51100 Reims, France

² INRA, UMR1402 ECOSYS, F-78000 Versailles, France

³ Université de Rouen, IRESE A, Ecodiv EA-1293, F-76821 Mont-Saint-Aignan, France

⁴ INRA, UMR1347 Agroécologie, F-21034 Dijon, France

⁵ INRA, UR1158 AgroImpact, F-02000 Barenton-Bugny, France

⁶ University of Copenhagen, Department of Biology, DK-2100 Copenhagen, Denmark

⁷ ELISOL environnement, F-30111 Congénies, France

Abstract

Promoting diverse and functioning biological communities is an important objective of agroecology, with increasing attention given to the important role of soil biodiversity. In an experimental study conducted in actual field conditions, we followed over five years the dynamic of multiple soil trophic groups in response to three alternatives to conventional crop management that varied in tillage, residue management and N fertilization regime.

Our study demonstrated a delayed but effective differentiation in soil invertebrate diversity following implementation of the varied agricultural practices. Soil biodiversity appeared dynamic with some groups responding more readily than others, thereby highlighting differences related to trophic position and body size. Particularly, the visualization of diversity profiles allowed uncovering an increasing impact of agricultural practices on group diversity towards higher trophic levels. While tillage appeared a main factor of influence, surprisingly little impact of residue management and nitrogen fertilization could be observed.

Heterogeneity of soil microhabitats together with complex interactions between soil organisms represents an important challenge in predicting the response of soil communities to anthropogenic influence. Through its multi-taxonomic approach, the present study advances our understanding of the dynamic of soil communities in agricultural cropping systems and helps identify possible consequences for soil functioning.

Keywords

Trophic groups; invertebrates; microorganisms; tillage; residues; fertilization

Introduction

Achieving sustainability is a worldwide current concern in agriculture that brings important challenges but also opportunities for rethinking agroecosystems (DeLong et al., 2015; Titttonell, 2014). The necessity of integrating ecological processes within food production systems has become the corner stone of agroecology (Wezel et al., 2014). Particularly, increasing consideration is given to soil biodiversity, whose role has long been underestimated by agronomists, but whose preservation is now recognized as key for maintaining or improving soil functioning capabilities, such as litter decomposition and nutrient cycling (de Graaff et al., 2015; Kassam et al., 2013; Kibblewhite et al., 2008; Zhang et al., 2015).

Soil communities are highly diverse and encompass a wealth of organisms with sizes ranging from the micro- to the macroscale that are embedded in a close network of direct and indirect interactions with each other and their environment (Giller, 1996; Moore et al., 2003). However, in agroecosystems soil community networks are often highly reduced compared to natural ecosystems and they are greatly influenced by agricultural practices that modulate the habitat structure and the quantity, quality and location of food resources for soil organisms (Roger-Estrade et al., 2010; Turmel et al., 2014). Besides the spatio-temporal distribution of crops, driving factors include tillage intensity, residue management and fertilization regimes, that can all be conjointly modulated to meet the purposes of agroecology (Wezel et al., 2014). Previous studies have shown similarities but also substantial variations and contradictions in the response of soil organisms to a given agricultural practice, depending on their taxonomic identity and resource acquisition strategies (Cole et al., 2008; Holland, 2004; Postma-Blaauw et al., 2010; Roger-Estrade et al., 2010; van Capelle et al., 2012).

Full-inversion tillage practices that bury crop residues into the soil have been related to relatively homogeneous soil communities, dominated by bacteria, bacteria-feeding protozoa and nematodes and rapidly reproducing invertebrate taxa, such as small euedaphic predatory mites (Koehler, 1999; Wardle, 1995). Previous studies have found that decreasing soil disturbance, for example by adopting conservation tillage, can benefit soil organisms in several ways including reduced rates of mechanical injuries, improved habitat structure and lower exposure to predators (Brussaard et al., 2007; Pelosi et al., 2015; Roger-Estrade et al., 2010; Wardle, 1995). Further, leaving residues at the soil surface has been viewed as positive for sustaining diverse soil communities because residues foster microorganism activity and provide favorable structural and microclimatic habitat conditions for a range of taxa (Chan, 2001; Cochran et al., 1994; Govaerts et al., 2007; Kladvko, 2001; Landis et al., 2000). Particularly, the resulting long-standing layer of organic matter in the upper soil should favor the presence of detritivorous taxa and their predators (Goncharov and Tiunov, 2014; Kladvko, 2001; Stinner and House, 1990), as well as enable the

expansion of fungal populations, an important trophic resource for many microbi-detritivore arthropods, such as Collembola and oribatid mites (Cochran et al., 1994; Hendrix et al., 1986). Reducing mineral fertilization is as well generally encouraged in the context of agroecology as a more sustainable practice (Gliessman, 2007). Mineral nitrogen input may have indirect effect throughout the soil communities by affecting the abundance and diversity of microorganisms (Fierer et al., 2012; Geisseler and Scow, 2014) and has been shown to indirectly enhance densities of microarthropods in grasslands (Cole et al., 2008). However, little evidence exists that reducing fertilization affects soil invertebrates in arable systems (Kanal, 2004; Verhoef and Brussaard, 1990).

In view of the existing literature, adopting new agricultural management strategies will lead to changes in taxonomic diversity, as well as in the size and trophic constitution of soil communities. Nonetheless, few studies have assessed and compared the temporal dynamics of soil communities across a range of taxonomic groups in cropping systems (Thiele-Bruhn et al., 2012). In the present study, we addressed this knowledge gap by purposely modulating agricultural management strategies in actual field conditions to investigate the dynamics of an extensive soil community along the course of an annual crop rotation. Specifically, we compared overall diversity as well as the abundance and diversity of several trophic groups in a conventionally managed crop rotation and three alternative treatments that varied in tillage, residue management and N fertilization regime. We expected to observe the largest temporal differentiation in alternative treatments that modulated both habitat and food resources. Leaving residues at the soil surface was expected to increase microbial decomposer biomass and diversity, as well as the abundance and diversity of microbi-detritivorous microarthropods and their predators. We also expected reduced tillage to progressively increase taxonomic diversity by enabling the establishment of taxa sensitive to disturbance, principally large size taxa with low reproductive rates such as earthworms. In contrast, small size taxa with high reproductive rates such as microbivores should be little affected by changes in agricultural practices. Finally, we expected reduced N fertilization to primarily affect microorganism diversity with little consequences for higher trophic groups.

Material & Methods

Experimental site

The study was conducted on the SOERE ACBB (Systèmes d'Observation et d'Expérimentation pour la Recherche en Environnement Agrosystèmes Cycles Biogéochimiques et Biodiversité) experiment for arable crops, located at Estrées-Mons, Northern France (49.873 N, 3.032 E). The experiment was established on a 8 ha field, which had been cropped with annual arable crops for many years before the onset of the experiment. In 2010, after 2 years of complete homogenization with the same crop (wheat in

2008 then barley in 2009) and same conventional management, a six-year rotation was initiated, composed of spring pea (*Pisum sativum*, L.), winter wheat (*Triticum aestivum*, L.), rapeseed (*Brassica napus*, L.), spring barley (*Hordeum vulgare*, L.), maize (*Zea mays*, L.) and winter wheat. The experiment started in March 2010 (called T0) at pea sowing. The experiment included 6 treatments with 4 replicates within a randomized block design. Four treatments were investigated in the present study, varying in soil tillage (full-inversion ploughing (CONV) vs shallow tillage (RT)), crop residue management (returned vs removed (RR) and N fertilization rate (reference rate vs one third of reference rate (RN)) (Table 1).

Tillage depth was about 25 cm in the ploughed treatments and 8 cm in the shallow tillage treatments. Crop residues were returned to soil every year except in treatment RT-RR, in which residues were exported: the mean amount of C returned through aerial residues was 3.2 and 1.6 t C ha⁻¹ yr⁻¹ during the studied period for the crop residue returned and exported treatments, respectively. Over the full rotation, the mean fertilization rate was 134 kg N ha⁻¹ yr⁻¹ except for treatment RN which received 43 kg N ha⁻¹ yr⁻¹. The soil is a deep loamy soil (Orthic-Luvisol, FAO classification); its main initial characteristics are given in Table 2. There was no significant difference in any characteristics between treatments. The climate is oceanic with continental influence, with a mean rainfall of 678 mm per year and an average temperature of 10.8 °C during the five years of study (2010-2014).

Sampling

Sampling of soil organisms was concomitantly performed in each plot, in March 2010, March 2012, and March 2014 at the start of the vegetation season in each of the four replicates per treatment (16 sampled plots in total). Sampling methodology was adapted for each taxonomic group to obtain a representative sample, as described below.

Microorganisms were collected from five soil cores (0-20 cm depth) taken each year at each plot. The five cores per plot were then pooled to obtain one sample per plot for each year. Soil samples were placed in plastic containers, stored in cool boxes at 4 °C and transported to the laboratory for further processing. In the laboratory, soil samples were sieved at 4 mm, divided into four homogeneous parts and placed into 50 ml polypropylene pill boxes. Microbial DNA was extracted from 1 g of all samples, using a single procedure standardized by the GenoSol platform (http://www.dijon.inra.fr/plateforme_genosol) (Terrat et al., 2012). DNA concentrations of crude extracts were determined by electrophoresis in 1% agarose gel using a calf thymus DNA standard curve, and used as estimates of microbial molecular biomass (Dequiedt et al., 2011). Bacterial and fungal diversities were determined by 454 pyrosequencing of ribosomal genes. For bacteria, a 16S rRNA gene fragment with sequence variability and the appropriate size (about 450 bases) for 454 pyrosequencing was amplified by PCR using primers F479 and R888. For fungi, an 18S

rRNA gene fragment of about 350 bases was amplified using primers FR1 and FF390. Primers and PCR conditions were as described previously (Tardy et al., 2014). The PCR products were purified using a MinElute gel extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and quantified using the PicoGreen staining Kit (Molecular Probes, Paris, France). A second PCR of 9 cycles was then conducted under similar PCR conditions with purified PCR products and ten base pair multiplex identifiers added to the primers at 5' position to specifically identify each sample and avoid PCR bias. Finally, the PCR products were purified and quantified as previously described (Tardy et al., 2014). Pyrosequencing was then carried out on a GS FLX Titanium (Roche 454 Sequencing System). Taxonomic units were derived from high-quality reads that were obtained from a procedure initially described by Terrat et al. (2012) using Gns-PIPE developed by the GenoSol platform (INRA, Dijon, France).

Microfauna (Nematoda and Protozoa) and microarthropods (Collembola, Acari) were sampled using steel cylinders (5 cm in diameter, depth 5 cm). Three (microarthropods) and five (microfauna) cores were taken each year at each plot. All samples of microarthropods were placed into separate plastic containers. Regarding microfauna samples, the five cores taken at each plot were carefully mixed and an aliquot of 250 g was used for extractions. All samples were then transported to the laboratory in cool boxes, and stored at 4 °C before further treatments.

Protozoan abundance was determined using a 5 g (fresh mass) sub-sample of sieved soil that was mixed with 100 ml of 1/300 tryptic soy broth (TSB) solution and homogenized for 1 min in a household blender. From this suspension eight threefold dilution series of 12 dilutions were prepared in microtiter plates, with 1/300 TSB solution used as growth medium. The microtiter plates were stored in the dark at 11 °C and checked for the presence/absence of Protozoa after 1 and 3 weeks. Total number of Protozoa was estimated using the most probable number method (Ronn et al., 1995). Nematodes were extracted and identified using ISO 23611-4 (ISO, 2007). The nematodes were extracted from approximately 300 g wet soil by Oostenbrink elutriation, followed by an active pass through a cotton wool filter for 48 hours; they were then counted using a binocular microscope. The composition of the soil nematofauna was determined after fixing in a formaldehyde-glycerol mixture and transferring to mass slides. On average, 185 nematodes per mass slide were identified to the family or genus level at 400 X magnification. Microarthropods were extracted by the dry-funnel method and stored in 70% ethyl alcohol. Under dissecting microscope, Collembola, Oribatida and Gamasinae were sorted out and enumerated. Collembola were determined to the species level following several keys (Dunger and Schlitt, 2011; Gisin, 1960; Potapov, 2001).

Ground-dwelling macroinvertebrates were sampled using pitfall traps. The traps were made from 7-cm diameter plastic cups, inserted into the soil with their top flushing the soil surface. They were sheltered

from rain by plastic cup lids over the traps using support sticks, raised to about 2 cm above the soil. The traps were partly filled with vinegar used as a preservative medium. Traps were left for 1 week and the collected contents preserved in ethanol (90%) for ulterior identification. In addition, soil-dwelling macroinvertebrates, were hand-sorted from a 25 x 25 x 25 cm monolith of soil and then preserved in 90%-alcohol. Most individuals were identified at least to the family level and Aranae, Carabidae and Lumbricidae were further identified to the species level. Fauna Europea (2013) was used as standard for invertebrate taxonomy.

Statistical analyses

Collected soil organisms were classified into eight trophic groups according to size and feeding regime: surface predators (spiders, carabid and rove beetles), mesopredators (mesostigmatid mites), micropredators (predaceous and omnivorous nematodes), microbi-detritivores (springtails and oribatid mites), microbivores (Protozoa and microorganism-feeding nematodes), microphytophages (plant-feeding nematodes), geosaprophages (earthworms) and decomposers (microorganisms). The effect of sampling year and agricultural treatments on the abundance of each group and on the biomass of microorganisms was evaluated using generalized linear models (glm) with quasi Poisson error distribution and log-link function. Block effect was accounted for by entering the factor “block” as the first independent variable in each glm. Model significance was tested by conducting F-test, and Tukey test was used post-hoc to identify differences between the levels of significant factors. Separate tests for each date were computed only if the interaction between date and treatments appeared not significant.

The diversity of each group was computed and compared for each year and treatment using diversity profiles as proposed by Chao et al. (2014). This method was chosen because it associates in a single framework a range of popular diversity indices, thereby providing a comprehensive and meaningful way of comparing the diversity of ecological communities (Leinster and Cobbold, 2012). Diversity profiles are a mean to visualize the diversity of a taxonomic (species-based) assemblage in relation to the abundance distribution of its component taxa. Diversity is expressed as Hill numbers (also called “effective number of species”) according to the equation: ${}^qH = (1 - \sum_{i=1}^S p_i^q) / (q - 1)$, (Equation 1)

p represents the relative abundance of taxa and q is a measure of the metric sensitivity to taxa relative abundance and can be understood as a weighting parameter of rare taxa. In a diversity profile, H is plotted versus a range of q values. Most commonly measured diversity indices are special cases of Hill numbers, with Hill numbers of order $q = 0$ corresponding to species richness, $q = 1$ to Shannon entropy and $q = 2$ to Simpson diversity. Thus, various orders of q emphasize different aspects of diversity, from describing the

diversity of essentially rare taxa at low values of q to describing the diversity of most abundant taxa at large values of q .

For surface predators, mesopredators, microbi-detritivores and earthworms, taxa determined to the species level were considered. For micropredators, microbivores and microphytophages, no species information was available and diversity was assessed at the family level. For microorganisms, diversity profiles were computed separately for bacteria and fungi at the genus level.

General trends of global soil biodiversity were assessed based on the number (taxonomic richness) and composition of all sampled families. Response of family richness to date and agricultural treatments was tested using a generalized linear model with quasi Poisson error distribution and log-link function. Block effect was accounted for by specifying block as first factor in the model and model significance was tested with F-test. Differences in family composition between treatments were analyzed using distance-based analysis of variance. First, a distance matrix based on family presence-absence at each sampling plot was calculated using Jaccard dissimilarity (Koleff et al., 2003). Differences in family assemblages between agricultural treatments and date were then tested by permutational analysis of variance (PERMANOVA, Anderson, 2001). Results were visually displayed using non metric multidimensional scaling (NMDS). For significantly different assemblages between treatments, Jaccard dissimilarity was further partitioned into its turnover and richness difference fractions (Carvalho et al., 2012; Legendre, 2014). Turnover expresses the replacement of a family by another one, while richness difference measures the difference in the number of families between sample plots. Thereby, it allows assessing whether dissimilarities mainly resulted from changes in the identity or in the number of families. Significance of the different fractions in explaining differences between treatments was tested with PERMANOVA.

Because T0 represents initial conditions with undifferentiated treatments, any textual or graphical reference to treatments at T0 must be understood as initial variability between sampling plots. All statistical analyses were performed using the software R, version 3.1.1 (R Core Team, 2014).

Results

Abundance / biomass of trophic groups

We observed no significant interaction between dates and treatments for the abundances of all trophic groups. This means that abundances followed similar temporal trajectories in the four treatments. However, micropredator and geosaprophage abundance showed a trend towards divergent differentiation with time ($F = 2.34$, $p = 0.054$; $F = 2.28$, $p = 0.059$), with abundance increasing from date T2 to T4 in the

treatments with reduced tillage only. All groups except microbivores showed differences in abundance, either as a response to date, to treatment at some date, or to both factors (Table 3, Fig. 1).

Temporal dynamics differed between the groups. The abundance of surface predators increased quite regularly over time and was significantly higher at date T4 than at date T0 (+ 84 %, $F = 4.98$, $p < 0.001$). The abundance of Microbi-detritivores reached significantly higher values already at date T2 (+ 181 %, $F = 10.21$, $p < 0.001$) and those high values were maintained at date T4. Similar increase from T0 to T2 was observed for mesopredator abundance and microorganism biomass (+ 267%, $F = 16.45$, $p < 0.001$; + 50 %, $F = 16.68$, $p < 0.001$), however, it was followed by a decrease at date T4. In contrast to the aforementioned groups, the abundance of microphytophages continuously decreased to reach low values for all treatments at T4 (- 82 %, $F = 13.29$, $p < 0.001$).

Abundance of several groups showed differences between treatments at some date, indicating that they were substantially influenced by agricultural practices. Abundance of mesopredators was 200 % higher in the RT compared to the CONV treatment at date T2 ($F = 3.73$, $p = 0.054$), while abundance of microbi-detritivores appeared more than 350 % higher in the RT-RR compared to the CONV treatment at dates T2 and T4 ($F = 3.99$, $p = 0.046$). Regarding micropredators, the highest abundance was recorded in the RT-RR treatment and was significantly different from the RN treatment at date T4 ($F = 4.81$, $p = 0.029$). Finally, the peak in microorganism biomass recorded at date T2 was 30 % higher in the RT and RT-RR treatments than in the CONV one ($F = 4.65$, $p = 0.031$).

Diversity profiles

Agricultural practices affected the diversity profiles of surface predators and microbi-detritivores, but not those of microbivores, bacteria and fungi (Fig. 2). For the remaining groups, the low number of taxa made interpretation of the diversity profiles equivocal, so that they could not be distinguished from initial conditions. Differentiation between treatments in diversity profiles of surface predators and microbi-detritivores occurred at low values of q , which indicated that differences between treatments occurred in the diversity of rare taxa but not in the diversity of common taxa. The diversity of surface predators was low at date T2, but markedly higher at date T4, with a steeper slope indicating more uneven abundance distribution between taxa resulting from an increase in the number of rarer taxa. Differences between the curves showed that diversity increased more in the RT-RR and RT treatments compared to the CONV and RN ones. In comparison, the diversity of microbi-detritivores showed a notable increase in the number of rare taxa in RT at date T2, whereas at date T4 all alternative treatments presented a number of rare taxa that was twice that of the CONV treatment.

Family richness and assemblage

The dynamics of family richness was best explained by an interaction between date and treatments resulting from a strong effect of agricultural practices on the magnitude of the dynamics at date T4 ($F = 3.23$, $p = 0.013$). While family richness at date T2 was similar to T0 and did not differ between the treatments, it significantly increased at date T4, with a stronger increase in the RT-RR (+48%) and RT (+32%) compared to the RN (+16%) and CONV (+13%) treatments (Fig. 3).

PERMANOVA analysis of family composition revealed a marginal interaction between date and treatments ($F = 1.53$, $p = 0.061$). Family composition showed a strong temporal dynamic ($F = 21.27$, $p < 0.001$), and was significantly different between treatments at date T4 ($F = 1.87$, $p = 0.029$), which indicated a differentiation in the fifth year. The decomposition of Jaccard dissimilarity at date T4 revealed that a significant part of variation in family composition between treatments was explained by a difference in family number ($F = 5.26$, $p = 0.020$), whereas family turnover was not related to agricultural practices ($F = 0.20$, $p = 0.857$). Visual display through NMDS showed two distinct clusters at date T4, one composed by the CONV and RN treatments and the other by the RT and RT-RR treatments (Fig. 4).

Discussion

In accordance with our expectations, the introduction of alternative agricultural practices influenced the soil community, with variations in the intensity of that effect depending on the trophic groups investigated. As predicted, we observed a positive effect of reduced tillage intensity on the abundance and diversity of predators and large-sized taxa. In contrast, we did not observe an effect of residue management that was expected as a result of altered trophic resources and microhabitat conditions. While we expected that reducing N fertilization without changing tillage intensity would not influence soil arthropods, the lack of response of the microorganism community disagreed with our predictions. These different aspects are detailed hereafter.

The diachronic approach used in our study allowed demonstrating an effective but delayed impact of agricultural practices on family richness at the community level. While no pattern of global family richness emerged after two years, all treatments (even the conventional one) reached higher family richness in the fifth year, which suggests that agricultural practices influenced the magnitude rather than the direction of the dynamics. Richness differences might be a result of active or passive arrival followed by distinct establishment success depending on the crop management practices. For example, although many surface predators actively colonize crops as adults, survival of their larvae can be significantly affected by agricultural practices (Holland and Reynolds, 2003), influencing species persistence and community diversity over time. Our results further highlight a temporal differentiation between treatments in family composition, with the emergence of two distinct clusters in the fifth year that partitioned

agricultural treatments according to their tillage regime. Two main processes can contribute to variation in the assemblage of taxonomic communities between locations. One is the turnover in taxonomic composition, whereby some taxa are replaced by others, and the second is the unequal number of taxa between locations (Carvalho et al., 2012; Legendre, 2014). In the present study, turnover was relatively high, accounting for 57% of the variation between sampling plots. However, this fraction was not significantly related to agricultural practices, indicating that turnover rate was as high within as between treatments. This variability in soil communities is not surprising and regularly reported given the heterogeneous soil microhabitat conditions (Ettema and Wardle, 2002; Franklin and Mills, 2003). In contrast, the part of variation attributed to differences in family number between sampled plots was significantly related to agricultural practices. This confirms that implementing alternative crop management strategies – mainly reduced tillage – can foster community richness over time. Unexpectedly, within reduced tillage treatments, family richness increased more in the removed compared to the return residue treatment, despite previous studies relating the presence of residues at the soil surface to favorable microclimatic conditions, higher trophic resources for decomposers and larger prey densities for predatory taxa (Kladravko, 2001). It is possible that the family level was too coarse to observe differences. Yet, this outcome is in line with a recent short-term study showing little effect of residue removal on soil arthropod diversity (Scheunemann et al., 2015) and did not contrast with our group-wise observations as highlighted below. Among different mechanisms, the small species pools, competition with local species and predator control may all have contributed to the results.

The response of the different trophic groups to variations in crop management strategies was contrasted, indicating that the impact of agricultural practices over time was related to trophic identity. Unexpectedly, the results did not indicate divergent trajectories of group abundances for the different agricultural management practices; however they supported the family-level observation that agricultural practices influenced the magnitude rather than the direction of the dynamics.

Surprisingly, the biomass of microbial decomposers was little influenced by crop management. Although biomass strongly rose from date T0 to T2 especially for the RT treatments, it dropped and became again homogeneous the fifth year, therefore providing no evidence for a consistent temporal differentiation between treatments. Moreover, the diversity of both bacterial and fungal communities remained remarkably constant over time and treatments, in contrast to previous studies that demonstrated shifts in microbial diversity as a result of tillage, residue management and fertilization regime (De Quadros et al., 2012; Pascault et al., 2010; Wang et al., 2011). Sampling depth is an important factor to consider to explain our results, since agricultural practices affect the vertical distribution of organic matter and microorganisms (Kuntz et al., 2013; Mathew et al., 2012). Organic matter and microorganisms generally

concentrate in the top-soil in reduced-tillage systems, whereas such stratification is absent in ploughed systems (Vian et al., 2009). Therefore, differentiation in microbial biomass and diversity between agricultural practices may occur at fine spatial scale, i.e. in the 0-5 cm top soil layer, and our results suggest that such differences weaken when considering the larger 0-20 layer. Alternatively, microbial feeders may adapt their grazing pressure in function of microorganism abundance, thereby keeping the biomass of microbial decomposers constant (Sohlenius, 1990).

The increase in biomass of microbial decomposers at date T2 may have driven the synchronous increase of their microbi-detritivore consumers and in turn mesopredator abundances. Microbi-detritivore abundance remained high at date T4 even if microbial biomass decreased, possibly because microbi-detritivores shifted their diet towards more abundant detrital resources (Ngosong et al., 2009). Surprisingly, highest abundance of microbi-detritivores occurred in the RT-RR treatment despite residue removal. Although surface residues can provide favorable microhabitat conditions and food resources (Cochran et al., 1994), Brennan et al. (2006) similarly observed higher springtail populations in sites without surface residues. Increased predator pressure may explain the pattern, since mesopredator abundances tended to be higher in the RT treatment, yet relatively low at date T4. In contrast to microbi-detritivores, the presence of surface residues likely supported high abundances of mesopredators in the RT treatment, as this group was shown to particularly benefit from residue addition (Scheunemann et al., 2015). The following decline at date T4 might relate to factors such as crop nature, microclimatic conditions or decrease in other prey resources (e.g., phytophagous nematodes). Alternatively, the observed increase in surface predator abundance suggests possible top-down control, although such interactions have hardly been investigated yet (Lawrence and Wise, 2004).

Substantial differentiation in the diversity profile of surface predators at date T4 and trends towards differentiation in abundance over time suggests an effective, but delayed response of taxa at the top of the food chain to changes in agricultural practices. Such temporal lag may help explain the inconsistency between studies investigating the impacts of crop management strategies on macropredators (Holland, 2004). Differentiation was more obvious for diversity than for abundance, which is not surprising since communities in agroecosystems are generally dominated by a few highly abundant taxa that can thrive under harsh environmental conditions (Holland and Luff, 2000; Mallis and Hurd, 2005; Melnychuk et al., 2013). The high diversity observed in reduced-tillage treatments and particularly in RT-RR suggests a bottom-up process, driven by the abundance of microbi-detritivores that represent important prey resources (Chen and Wise, 1999). In addition to enhanced prey abundance, surface predators likely benefited from lower soil physical disturbance, which may have enabled more sensitive taxa to establish

(Holland, 2004; Nuria et al., 2011). As for microbi-detritivores, no evidence of a negative effect of residue exportation was found, suggesting that it did not significantly impaired microhabitat conditions.

In comparison to the other groups, microbivores showed little variation in abundance and diversity both in time and between the different treatments. This outcome is consistent with several previous studies that found microorganism-feeding taxa to be little responsive to changes in agricultural practices (Sánchez-Moreno et al., 2011; Stinner and Crossley, 1982; Tsiafouli et al., 2015; Wardle, 1995; but see Bloem et al., 1994), which has been related to their life strategy and particularly their high reproduction rate (Bongers and Bongers, 1998). Additionally, microcosm studies demonstrated that microbivore-feeders can exert a substantial control over their prey populations (Laakso and Seta, 1999; Mikola and Setälä, 2014). Whereas significant changes in microbivore diversity may result from a different response of bacteria-feeding and fungi-feeding nematodes (e.g., Okada and Harada, 2007), the lack of differentiation in bacterial and fungal diversity might explain why the curves of the microbivore diversity profile remained similar and constant in time.

Abundances of both microphytophages and micropredators decreased over time, although for the latter group, abundances recovered at date T4 in the RT-RR and RR treatments. This result indicates that crop succession was a main factor driving phytophagous nematode abundances, regardless of the agricultural treatments. It might relate to the different rooting structures of the successive crop plants (Neher, 2010). The decline of plant-feeding nematodes over time may in turn have influenced that of predatory nematodes for which they are a non-negligible prey (Khan et al., 2007). In reduced tillage treatments, abundance of predatory nematodes was likely fostered by the availability of alternative prey, such as microbi-detritivores.

In accordance with our expectations, earthworm abundance increased in reduced-tillage treatments compared to ploughed ones and was highest when residues were present at the soil surface. Our results therefore confirm the beneficial impact of conservation tillage on earthworm population sizes (Chan, 2001; Mele and Carter, 1999; Simonsen et al., 2010). However, species diversity remained low, possibly because the highly homogeneous landscape matrix of our study area limited the possibilities for colonization from external sources such as uncropped areas (Hof and Bright, 2010; Ryskowski and Jankowiak, 2002; but see Roarty and Schmidt, 2013).

Conclusion

Enhancing the diversity of soil invertebrates in crops is an integrative part of the development of modern agro-ecological schemes. However, how the implementation of alternative crop management strategies

affects the structure and temporal dynamics of soil biological communities is a key aspect that has been little considered. The present study is one of the first that investigated over several years and in actual field conditions the differentiation of soil invertebrate diversity across multiple taxa. Our results demonstrated the potential of alternative agricultural practices to enhance the taxonomic richness of soil communities within a few years. Tillage was identified as a dominant factor of influence, in contrast to crop residue management and fertilization regime that appeared to little influence the dynamic of soil invertebrates. Variation in time and form of the response of the different trophic groups not only highlighted varying sensitivities related to trophic level but also allowed identifying coupled dynamics driven by feeding interactions. Thus, because community functioning and stability depends on the way its component species interact with one another across time, modelling the structure of soil food webs may represent a promising next step for predicting the response of soil biological communities to alternative crop management strategies. The capacity of more diverse communities to improve soil functioning will need to be evaluated. Our study provides first elements, with changes at mid and high trophic levels likely reflecting high basal biological activity and a potential for higher pest control by predatory species.

Acknowledgements

We thank N. Brunet for his involvement in the project set-up and J. Amossé for his collaboration in data processing. We thank N. Cheviron, C. Marraud E. Ollivier, J.-P. Pétraud, J. Thénard and A. Trouvé (UMR Ecosys) for their participation in field sampling of macroinvertebrates and J. Thénard for macroinvertebrate identification. We thank S.F.M. Coulibaly, G. Perez and S. Saj for their help in Collembola and Protozoa sampling and identification. We thank also the technical team in charge of the SOERE experiment in Estrées-Mons for providing help during the fieldwork stays, and J. Duval who managed the organization of all collected data in a database and developed a web site for provisioning those data. The present study was funded through the SOFIA project (ANR Agrobiosphere, ANR-11-AGRO-0004) which provided a post-doctoral grant to Valérie Coudrain.

References

- Anderson, M.J., 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* 26, 32–46.
- Bloem, J., Lebbink, G., Zwart, K.B., Bouwman, L.A., Burgers, S.L., de Vos, J.A., de Ruiter, P.C., 1994. Dynamics of microorganisms, microbivores and nitrogen mineralisation in winter wheat fields under conventional and integrated management. *Agric. Ecosyst. Environ.* 51, 129–143.
- Bongers, T., Bongers, M., 1998. Functional diversity of nematodes. *Appl. Soil Ecol.* 10, 239–251.
- Brennan, A., Fortune, T., Bolger, T., 2006. Collembola abundances and assemblage structures in conventionally tilled and conservation tillage arable systems. *Pedobiologia.* 50, 135–145.
- Brussaard, L., Pulleman, M.M., Ouédraogo, É., Mando, A., Six, J., 2007. Soil fauna and soil function in the fabric of the food web. *Pedobiologia.* 50, 447–462.

- Carvalho, J.C., Cardoso, P., Gomes, P., 2012. Determining the relative roles of species replacement and species richness differences in generating beta-diversity patterns. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 21, 760–771.
- Chan, K.Y., 2001. An overview of some tillage impacts on earthworm. *Soil Tillage Res.* 57, 179–191.
- Chao, A., Chiu, C.-H., Jost, L., 2014. Unifying species diversity, phylogenetic diversity, functional diversity and related similarity/differentiation measures through hill numbers. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 45, 297–324.
- Chen, B., Wise, D.H., 1999. Bottom-up limitation of prdaceus arthropods in a dertritrus-based terrestrial food web. *Ecology* 80, 172–761.
- Cochran, V., Sparrow, S., Sparrow, E., 1994. Residue effects on soil micro- and macroorganisms, in: Unger, P.W. (Ed.), *Managing Agricultural Residues*. Boca Raton, FL, pp. 163–184.
- Cole, L., Buckland, S.M., Bardgett, R.D., 2008. Influence of disturbance and nitrogen addition on plant and soil animal diversity in grassland. *Soil Biol. Biochem.* 40, 505–514.
- De Graaff, M.-A., Adkins, J., Kardol, P., Throop, H.L., 2015. A meta-analysis of soil biodiversity impacts on the carbon cycle. *Soil* 1, 257–271. doi:10.5194/soil-1-257-2015
- De Jong, Y.S.D.M., 2013. *Fauna Europaea* [WWW Document]. version 2.6. URL <http://www.faunaeur.org>
- De Quadros, P.D., Zhalnina, K., Davis-Richardson, A., Fagen, J.R., Drew, J., Bayer, C., Camargo, F., Triplett, E.W., 2012. The effect of tillage system and crop rotation on soil microbial diversity and composition in a subtropical acrisol. *Diversity* 4, 375–395.
- DeLong, C., Cruse, R., Wiener, J., 2015. The soil degradation paradox: Compromising our resources when we need them the most 7, 866–879.
- Dequiedt, S., Saby, N.P.A., Lelievre, M., Jolivet, C., Thioulouse, J., Toutain, B., Arrouays, D., Bispo, A., Lemanceau, P., Ranjard, L., 2011. Biogeographical patterns of soil molecular microbial biomass as influenced by soil characteristics and management. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 20, 641–652.
- Dunger, W., Schlitt, B., 2011. Synopses on Palaearctic Collembola – Tullbergiidae. *Soil Org.* 1, 1–168.
- Ettema, C.H., Wardle, D.A., 2002. Spatial soil ecology. *Trends Ecol. Evol.* 17, 177–183.
- Fierer, N., Lauber, C.L., Ramirez, K.S., Zaneveld, J., Bradford, M.A., Knight, R., 2012. Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *ISME J.* 6, 1007–1017.
- Franklin, R.B., Mills, A.L., 2003. Multi-scale variation in spatial heterogeneity for microbial community structure in an eastern Virginia agricultural field. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44, 335–346.
- Geisseler, D., Scow, K.M., 2014. Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms - A review. *Soil Biol. Biochem.* 75, 54–63.
- Giller, P.S., 1996. The diversity of soil communities, the poor man’s tropical rainforest? *Biodivers. Conserv.* 5, 135–168.
- Gisin, H., 1960. *Collembolen fauna Europas*. Genève, pp. 1–312.
- Gliessman, S.R., 2007. *Agroecology: The ecology of sustainable food systems*, CRC Press. ed. Boca Raton, FL.
- Goncharov, A., Tiunov, V., 2014. Trophic chains in soil. *Biol. Bull. Rev.* 4, 393–403.

- Govaerts, B., Mezzalama, M., Unno, Y., Sayre, K.D., Luna-Guido, M., Vanherck, K., Dendooven, L., Deckers, J., 2007. Influence of tillage, residue management, and crop rotation on soil microbial biomass and catabolic diversity. *Appl. Soil Ecol.* 37, 18–30.
- Hendrix, P.F., Parmelee, R.W., Crossley, D.A., Coleman, D.C., Odum, P., Groffman, P.M., 1986. Detritus food in webs and conventional agroecosystems. *Bioscience* 36, 374–380.
- Hof, A.R., Bright, P.W., 2010. The impact of grassy field margins on macro-invertebrate abundance in adjacent arable fields. *Agric. Ecosyst. Environ.* 139, 280–283.
- Holland, J.M., 2004. The environmental consequences of adopting conservation tillage in Europe: Reviewing the evidence. *Agric. Ecosyst. Environ.* 103, 1–25.
- Holland, J.M., Luff, M.L., 2000. The effects of agricultural practices on Carabidae in temperate agroecosystems. *Integr. Pest Manag. Rev.* 5, 109–129.
- Holland, J.M., Reynolds, C.J.M., 2003. The impact of soil cultivation on arthropod (Coleoptera and Araneae) emergence on arable land. *Pedobiologia* 47, 181–191.
- ISO 23611-4, 2007. Soil quality -- Sampling of soil invertebrates -- Part 4: Sampling, extraction and identification of soil-inhabiting nematodes.
- Kanal, A., 2004. Effects of fertilisation and edaphic properties on soil-associated Collembola in crop rotation. *Agron. Res.* 2, 153–168.
- Kassam, A., Basch, G., Friedrich, T., Shaxson, F., Goddard, T., Amado, T.J.C., Crabtree, B., Hongwen, L., Melo, I., Pisante, M., Mkomwa, S., 2013. Sustainable soil management is more than what and how crops are grown, in: *Principles of Sustainable Soil Management in Agroecosystems*. pp. 337–400.
- Khan, Z., Khan, Z., Kim, Y.H., Kim, Y.H., 2007. A review on the role of predatory soil nematodes in the biological control of plant parasitic nematodes. *Appl. Soil Ecol.* 35, 370–379.
- Kibblewhite, M.G., Ritz, K., Swift, M.J., 2008. Soil health in agricultural systems. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 363, 685–701.
- Kladivko, E.J., 2001. Tillage systems and soil ecology. *Soil Tillage Res.* 61, 61–76.
- Koehler, H.H., 1999. Predatory mites (Gamasina, Mesostigmata) 74, 395–410.
- Koleff, P., Gaston, K.J., Lennon, J.J., 2003. Measuring beta diversity for presence –absence data. *J. Anim. Ecol.* 72, 367–382.
- Kuntz, M., Berner, a., Gattinger, a., Scholberg, J.M., Mäder, P., Pfiffner, L., 2013. Influence of reduced tillage on earthworm and microbial communities under organic arable farming. *Pedobiologia* 56, 251–260.
- Laakso, J., Seta, H., 1999. Population- and ecosystem-level effects of predation on microbial-feeding nematodes. *Oecologia* 279–286.
- Landis, D.A., Wratten, S.D., Gurr, G.M., 2000. Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture 45, 175–201.
- Lawrence, K.L., Wise, D.H., 2004. Unexpected indirect effect of spiders on the rate of litter disappearance in a deciduous forest. *Pedobiologia* 31, 149–157.

- Legendre, P., 2014. Interpreting the replacement and richness difference components of beta diversity. *Glob. Ecol. Biogeogr.* doi:10.1111/geb.12207
- Leinster, T., Cobbold, C.A., 2012. Measuring diversity: the importance of species similarity. *Ecology* 93, 477–489.
- Mallis, R.E., Hurd, L.E., 2005. Diversity among ground-dwelling spider assemblages: Habitat generalists and specialists. *J. Arachnol.* 33, 101–109.
- Mathew, R.P., Feng, Y., Githinji, L., Ankumah, R., Balkcom, K.S., 2012. Impact of no-tillage and conventional tillage systems on soil microbial communities. *Appl. Environ. Soil Sci.* 2012, 1–10.
- Mele, P., Carter, M., 1999. Impact of crop management factors in conservation tillage farming on earthworm density, age structure and species abundance in south-eastern Australia. *Soil Tillage Res.* 50, 1–10.
- Melnychuk, N.A., Olfert, O., Youngs, B., Gillott, C., 2013. Abundance and diversity of Carabidae (Coleoptera) in different farming systems 95, 69–72.
- Mikola, J., Setälä, H., 2014. No evidence of trophic cascades in an experimental microbial-based soil food web. *Ecology* 79, 153–164.
- Moore, J.C., McCann, K., Setälä, H., De Ruiter, P.C., 2003. Top-down is bottom-up: Does predation in the rhizosphere regulate aboveground dynamics? *Ecology* 84, 846–857.
- Neher, D.A., 2010. Ecology of plant and free-living nematodes in natural and agricultural soil. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 371–394.
- Ngosong, C., Raupp, J., Scheu, S., Ruess, L., 2009. Low importance for a fungal based food web in arable soils under mineral and organic fertilization indicated by Collembola grazers. *Soil Biol. Biochem.* 41, 2308–2317.
- Nuria, R., Jérôme, M., Léonide, C., Christine, R., Gérard, H., Etienne, I., Patrick, L., 2011. IBQS: A synthetic index of soil quality based on soil macro-invertebrate communities. *Soil Biol. Biochem.* 43, 2032–2045.
- Okada, H., Harada, H., 2007. Effects of tillage and fertilizer on nematode communities in a Japanese soybean field. *Appl. Soil Ecol.* 35, 582–598.
- Pascual, N., Nicolardot, B., Bastian, F., Thiébeau, P., Ranjard, L., Maron, P.A., 2010. In situ dynamics and spatial heterogeneity of soil bacterial communities under different crop residue management. *Microb. Ecol.* 60, 291–303.
- Pelosi, C., Bertrand, M., Thénard, J., Mougin, C., 2015. Earthworms in a 15 years agricultural trial. *Appl. Soil Ecol.* 88, 1–8.
- Postma-Blaauw, M.B., De Goede, R.G.M., Bloem, J., Faber, J.H., Brussaard, L., 2010. Soil biota community structure and abundance under agricultural intensification and extensification. *Ecology* 91, 460–473.
- Potapov, M., 2001. Synopses on Palaearctic Collembola, Part 3, Abhandlung. ed. Görlitz.
- Roarty, S., Schmidt, O., 2013. Permanent and new arable field margins support large earthworm communities but do not increase in-field populations. *Agric. Ecosyst. Environ.* 170, 45–55.
- Roger-Estrade, J., Anger, C., Bertrand, M., Richard, G., 2010. Tillage and soil ecology: Partners for sustainable agriculture. *Soil Tillage Res.* 111, 33–40.
- Ronn, R., Ekelund, F., Christensen, S., 1995. Optimizing soil extract and broth media for MPN enumeration of naked amoebae and heterotrophic flagellates in soil. *Pedobiologia.* 39, 10–19.

- Ryskowski, L., Jankowiak, J., 2002. Development of agriculture and its impact on landscape functions, in: Ryskowski, L. (Ed.), *Landscape Ecology in Agroecosystems Management*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Sánchez-Moreno, S., Ferris, H., Young-Mathews, A., Culman, S.W., Jackson, L.E., 2011. Abundance, diversity and connectance of soil food web channels along environmental gradients in an agricultural landscape. *Soil Biol. Biochem.* 43, 2374–2383.
- Scheunemann, N., Maraun, M., Scheu, S., Butenschoen, O., 2015. The role of shoot residues vs. crop species for soil arthropod diversity and abundance of arable systems. *Soil Biol. Biochem.* 81, 81–88.
- Simonsen, J., Posner, J., Rosemeyer, M., Baldock, J., 2010. Endogeic and anecic earthworm abundance in six Midwestern cropping systems. *Appl. Soil Ecol.* 44, 147–155.
- Sohlenius, B., 1990. Influence of cropping system and nitrogen input on soil fauna and microorganisms in a Swedish arable soil. *Biol. Fertil. Soils* 9, 168–173.
- Stinner, B., House, G., 1990. Arthropods and other invertebrates in conservation-tillage agriculture. *Annu. Rev. Entomol.* 35, 299–318.
- Stinner, B.R., Crossley, D.A., 1982. Nematodes in no-tillage agroecosystems, in: Freckman, D.W. (Ed.), *Nematodes in Soil Ecosystems*. Austin, pp. 14–28.
- Tardy, V., Mathieu, O., Lévêque, J., Terrat, S., Chabbi, A., Lemanceau, P., Ranjard, L., Maron, P.-A., 2014. Stability of soil microbial structure and activity depends on microbial diversity. *Environ. Microbiol. Rep.* 6, 173–83.
- Team, R.C., 2014. R: A language and environment for statistical computing.
- Terrat, S., Christen, R., Dequiedt, S., Lelièvre, M., Nowak, V., Regnier, T., Bachar, D., Plassart, P., Wincker, P., Jolivet, C., Bispo, A., Lemanceau, P., Maron, P.-A., Mougel, C., Ranjard, L., 2012. Molecular biomass and MetaTaxogenomic assessment of soil microbial communities as influenced by soil DNA extraction procedure. *Microb. Biotechnol.* 5, 135–41.
- Thiele-Bruhn, S., Bloem, J., de Vries, F.T., Kalbitz, K., Wagg, C., 2012. Linking soil biodiversity and agricultural soil management. *Curr. Opin. Environ. Sustain.* 4, 523–528.
- Tittonell, P., 2014. Ecological intensification of agriculture — sustainable by nature. *Curr. Opin. Environ. Sustain.* 8, 53–61.
- Tsiafouli, M.A., Thébault, E., Sgardelis, S.P., de Ruiter, P.C., van der Putten, W.H., Birkhofer, K., Hemerik, L., de Vries, F.T., Bardgett, R.D., Brady, M.V., Bjornlund, L., Jørgensen, H.B., Christensen, S., Hertefeldt, T.D., Hotes, S., Gera Hol, W.H., Frouz, J., Liiri, M., Mortimer, S.R., Setälä, H., Tzanopoulos, J., Uteseny, K., Pižl, V., Stary, J., Wolters, V., Hedlund, K., 2015. Intensive agriculture reduces soil biodiversity across Europe. *Glob. Chang. Biol.* 21, 973–985.
- Turmel, M.-S., Speratti, A., Baudron, F., Verhulst, N., Govaerts, B., 2015. Crop residue management and soil health: A systems analysis. *Agric. Syst.* 134, 6–16.
- Van Capelle, C., Schrader, S., Brunotte, J., 2012. Tillage-induced changes in the functional diversity of soil biota - A review with a focus on German data. *Eur. J. Soil Biol.* 50, 165–181.
- Verhoef, H. a., Brussaard, L., 1990. Decomposition and nitrogen mineralization in natural agro- ecosystems: The contribution of soil animals. *Biogeochemistry* 11, 175–211.
- Vian, J.F., P, J., C, R., R, J., 2009. Effects of four tillage systems on soil structure and soil microbial biomass in organic farming. *Soil Use Manag.* 25, 1–10.

- Wang, Y., Tu, C., Cheng, L., Li, C., Gentry, L.F., Hoyt, G.D., Zhang, X., Hu, S., 2011. Long-term impact of farming practices on soil organic carbon and nitrogen pools and microbial biomass and activity. *Soil Tillage Res.* 117, 8–16.
- Wardle, D.A., 1995. Impacts of disturbance on detritus food webs in agro-ecosystems of contrasting tillage and weed management practices, in: *Advances in Ecological Research*. pp. 105–185.
- Wezel, A., Casagrande, M., Celette, F., Vian, J.F., Ferrer, A., Peigné, J., 2014. Agroecological practices for sustainable agriculture. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 34, 1–20.
- Zhang, W., Yuan, S., Hu, N., Lou, Y., Wang, S., 2015. Predicting soil fauna effect on plant litter decomposition by using boosted regression trees. *Soil Biol. Biochem.* 82, 81–86.

Table 1. Description of the investigated treatments of SOERE ACBB for arable crops.

Code	Treatment	Soil tillage	Crop residue management	N fertilization rate
CONV	Conventional	Annual ploughing	Returned	Reference*
RT	Reduced tillage	Shallow tillage	Returned	Reference
RT-RR	Reduced tillage and residue removal	Shallow tillage	Exported	Reference
RN	Reduced nitrogen	Annual ploughing	Returned	32% of Reference

* the reference rate was calculated for each crop each year, according to a N balance-sheet method.

Table 2. Soil physico-chemical properties (0-20 cm) at the onset of the experiment (March 2010).

	Unit	Mean	Standard deviation
Clay	g kg ⁻¹	187.00	31.00
Silt	g kg ⁻¹	744.00	34.00
Sand	g kg ⁻¹	69.00	21.00
pH in water		8.20	0.10
Organic C	g kg ⁻¹	10.40	0.80
Total N	g kg ⁻¹	1.04	0.05
C/N		10.00	0.90
CaCO ₃	g kg ⁻¹	2.00	1.00
CEC*	cmol kg ⁻¹	12.00	1.00
Bulk density	g cm ⁻³	1.40	0.09

*cation exchange capacity

Table 3. Results of generalized linear models of the effect of date and treatments on the abundance / biomass of the different trophic groups. *P*-values < 0.06 are displayed in bold, with marginally significant results in italic.

	Surface predators		Mesopredators		Micropredators		Geosaprophages	
	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Date	4.98	0.011[†]	16.45	< 0.001[†]	2.72	0.056[†]	6.57	0.003[†]
Treatment								
Date T0	3.37	0.068	0.46	0.717	0.06	0.979	1.41	0.302
Date T2	0.72	0.564	3.73	0.054[†]	3.12	0.080	1.55	0.268
Date T4	3.62	0.058[†]	1.00	0.434	4.81	0.029[†]	6.50	0.012[†]
Treatment: Date	1.93	0.106	0.45	0.842	2.34	0.054	2.28	0.059

	Microbi-detritivores		Microbivores		Microphytophages		Microbial decomposers	
	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Date	10.21	< 0.001[†]	0.02	0.975	36.95	< 0.001[†]	16.68	< 0.001[†]
Treatment								
Date T0	2.46	0.129	0.50	0.692	1.84	0.209	0.50	0.690
Date T2	3.99	0.046[†]	0.50	0.691	0.75	0.550	4.65	0.031[†]
Date T4	3.99	0.046[†]	0.38	0.771	1.28	0.339	0.24	0.682
Treatment: Date	1.38	0.248	0.34	0.912	0.58	0.742	1.28	0.289

[†]Significant differences between dates (post-hoc Tukey tests) : Surface predators: T0<T4 ; mesopredators: T0<T4<T2 ; micropredators : T0>T2 ; geosaprophages : T0=T4<T2 ; microbi-detritivores : T0<T2=T4 ; microphytophages : T0>T2>T4 ; microbial decomposers: T0<T4<T2.

[‡] Significant differences between treatments (post-hoc Tukey tests): Surface predators: RT>RN ; mesopredators: RT>CONV ; geosaprophages: RT>RN=CONV ; micropredators: RT-RR>RN ; microbi-detritivores : RT-RR>CONV ; microbial decomposers: RT=RT-RR>CONV.

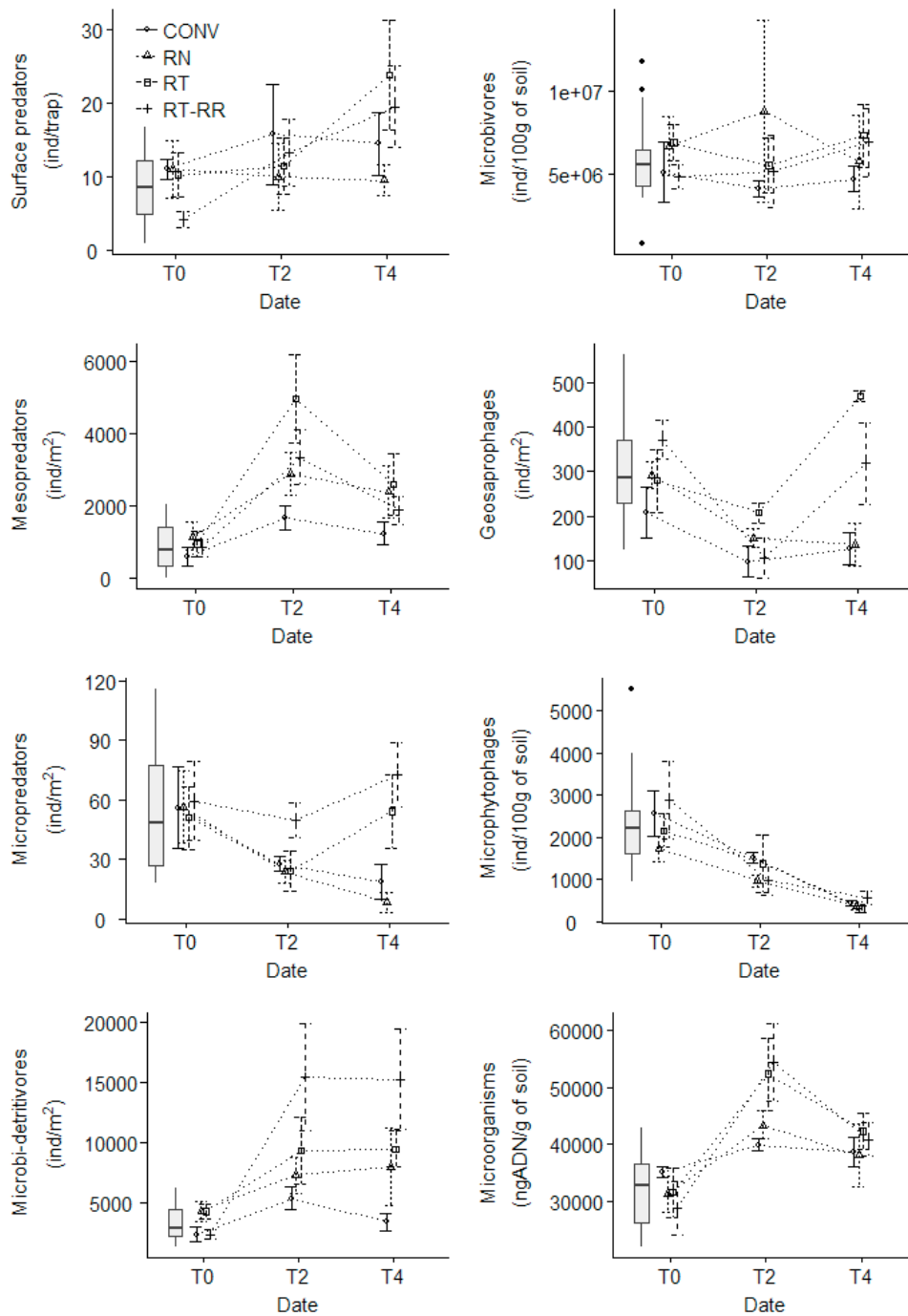


Fig.1. Mean abundance/biomass of the different trophic group in the four agricultural treatments in relation to sampling year. Error bars are standard error of the mean. Boxplots represent total initial data dispersion. Dotted lines are depicted as a visual aid and do not show actual trajectories.

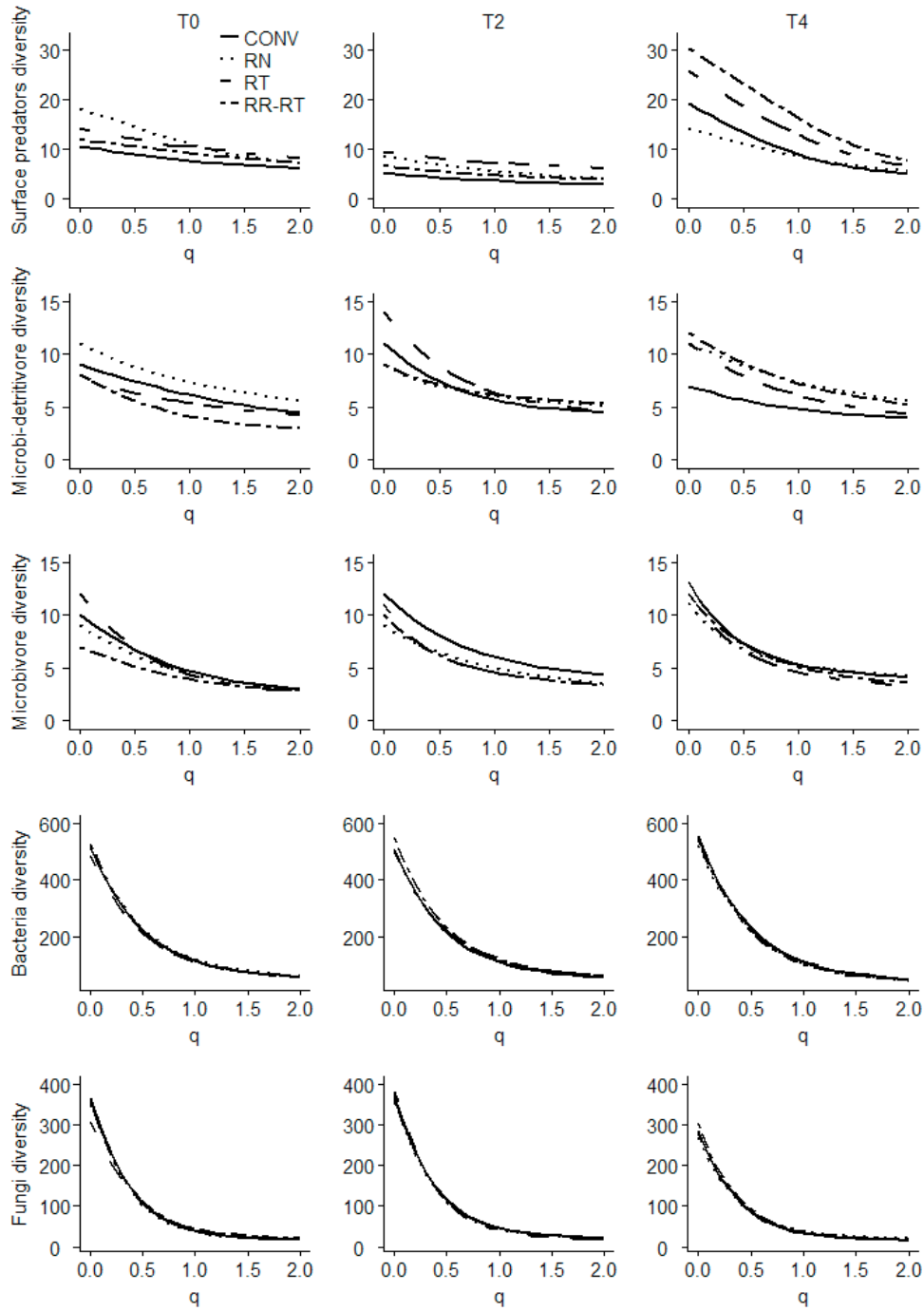


Fig.2. Diversity profiles of the different trophic groups. The y-axis represent *Hill's* effective number of species in relation to the weighing parameter q (Equation 1) on the x-axis, with weight given to common taxa increasing with increasing value of q . The different agricultural treatments were not implemented at date T0 and the distinction between curves serves as an indication of initial variability.

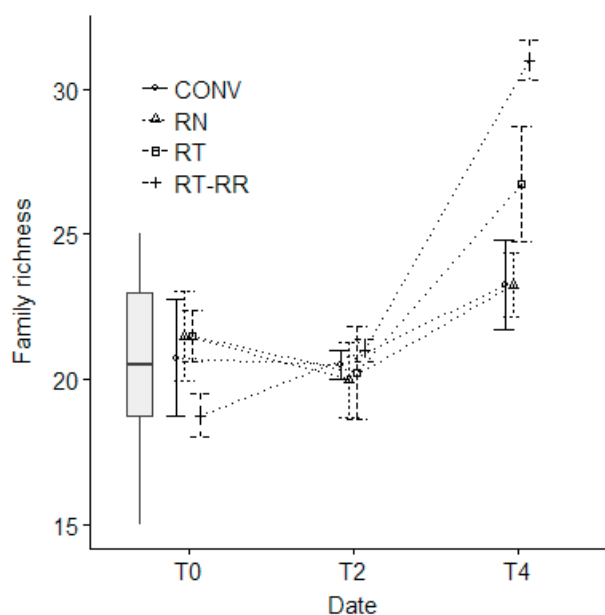


Fig.3. Mean of soil organism's family richness in the different treatments in relation to sampling year. Error bars are standard error of the mean. Boxplot represents initial data dispersion. Dotted lines are depicted as a visual aid and do not show actual trajectories.

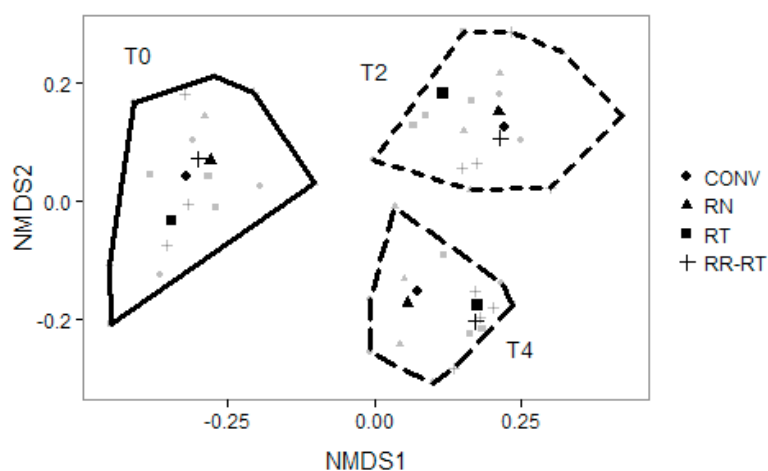


Fig.4. Non-metric multidimensional scaling of soil organism's family composition. Projected values are the scores of the two first NMDS factors. Each sampling year is represented by its convex hull, within which point shape characterizes the 16 sampling plots by their agricultural treatments. Mean value of each treatment is displayed in bold.