



RMQS *BioDiv* Bretagne

Tome 3 - Microbiologie
Tome 4 - Nématofaune du sol
Tome 5 - Nématodes phytoparasites

Coordinateur scientifique : Daniel CLUZEAU

Bellido A., Boulonne L., Cannavacciuolo M., Chaussod R., Cortet J., Fargette M.,
Giteau J-L., Guernion M., Jolivet C., Lavelle P., Foucaud-Lemercier B.,
Martin F., Mateille T., Mercier V., Péres G., Pernin C., Plantard O., Ponge J.F.,
Ranjard L., Rougé L., Ruiz N., Tico S., Velasquez H., Villenave C., Walter C.

Vol 3 / 2009



RMQS *BioDiv* Bretagne

Tome 3 : Microbiologie

Février 2006 – Février 2009

Coordinateur scientifique : Daniel CLUZEAU ³

Bellido³ A., Boulonne¹ L., Cannavacciuolo¹¹ M., Chaussod⁹ R., Cortet⁵ J., Fargette⁷ M., Giteau¹² J.-L., Guernion³ M., Jolivet¹ C., Lavelle⁴ P., Foucaud-Lemercier² B., Martin⁹ F., Mateille⁷ T., Mercier³ V., Péres³ G., Pernin⁵ C., Plantard⁸ O., Ponge⁶ J.F., Ranjard⁹ L., Rouge³ L., Ruiz⁴ N., Tico¹² S., Velasquez⁴ H., Villenave¹⁰ C., Walter² C.

¹ INRA Orléans InfoSol

² Agrocampus Rennes, UMR INRA SAS

³ Université de Rennes1, UMR CNRS *EcoBio*

⁴ Univ. Paris 12 - Bondy, UMR IRD *BioSol*

⁵ ENSAIA-INPL Nancy, UMR INRA *Sols et Environnement*

⁶ UMR CNRS Brunoy

⁷ IRD Montpellier, UMR *CBGP*

⁸ Agrocampus - INRA Rennes, UMR INRA *Bio3P*

⁹ INRA Dijon, UMR INRA MGS

¹⁰ IRD Montpellier, UMR *Eco&Sols*

¹¹ ESA Angers

¹² Chambre d'Agriculture de Bretagne



TOME 3 :

MICROBIOLOGIE

Biomasse microbienne et communautés microbiennes telluriques

Contributeurs au rapport & analyses de laboratoire

Rémi Chaussod, Fabrice Martin-Laurent, Jérémie Beguet, Samuel Dequiedt

Table des matières

INTRODUCTION	1
MATERIELS & METHODES	5
Méthodes de prélèvement et paramètres étudiés	5
Nombre d'échantillons traités.....	6
Démarche d'exploitation des données	6
1. Exploration des données	9
1.1 Caractérisation globale : biomasse microbienne et abondance relative de gènes bactériens	9
1.1.1. Biomasse microbienne (MOV)	9
1.1.2. Biomasse microbienne par rapport au carbone total (MOV% <i>Ct</i>).....	11
1.1.3. Abondance relative de gènes bactériens (ADNr 16 S).....	12
1.2 Caractérisation fonctionnelle : abondance relative des communautés fonctionnelles narG et pcaH	14
1.2.1. Abondance relative de la communauté dénitrifiante (<i>narG</i>)	14
1.2.2. Ratio <i>narG</i> /16S	16
1.2.3. <i>pcaH</i>	17
1.2.4. Ratio <i>pcaH</i> /16S	18
1.3 Caractérisation de la structure génétique des communautés bactériennes	19
1.4 Lien entre les paramètres microbiologiques	21
2. Approche spatiale	23
2.1 Structuration spatiale des paramètres microbiologiques	23
2.2 Structuration spatiale des communautés bactériennes fonctionnelles	27
3. Données microbiologiques et variables explicatives	31
3.1 Paramètres globaux et fonctionnels en lien avec les variables explicatives ...	31
3.1.1 Paramètres microbiologiques et paramètres physico-chimiques	31
3.1.2 Paramètres microbiologiques et occupation des sols	34
3.1.3 Paramètres microbiologiques et pratiques agricoles	38
3.1.4 Paramètres microbiologiques et caractéristiques pédologiques	42
3.1.5 Paramètres microbiologiques et année de prélèvement	46
3.1.6 Paramètres microbiologiques et humidité des sols	47
3.2 Structure génétique des communautés bactérienne en lien avec les variables explicatives	49
3.2.1 Données B-ARISA et paramètres physico-chimiques	49
3.2.2 Données B-ARISA et année de prélèvement	49
3.2.3 Données B-ARISA et « système d'occupation des sols »	50
3.2.4 Données B-ARISA et pratiques agricoles	51
SYNTHESE	53

INTRODUCTION

Dans le cadre de ses missions, l'ADEME est membre fondateur du Groupement d'Intérêt Scientifique Sol (GIS Sol¹) dont les objectifs sont de constituer et de gérer un système d'information sur les sols de France, par rapport à leur distribution spatiale, leurs propriétés et l'évolution de leurs qualités. Parmi les différents programmes menés par le GIS Sol, l'ADEME participe notamment au RMQS (Réseau de Mesure de la Qualité des Sols) dont le principal objectif est de mesurer périodiquement différentes variables afin d'être en mesure d'évaluer la qualité des sols et d'estimer son évolution (Jolivet, 2006). Actuellement, les mesures réalisées sont exclusivement physiques (ex : densité apparente) ou chimiques (ex : teneur en éléments traces). Ainsi, contrairement à d'autres réseaux européens de surveillance des sols, aucune mesure biologique n'est actuellement réalisée. Dès lors, le programme **RMQS BioDiv** a été accueilli très favorablement par le Haut Comité de Groupement du GIS Sol lors de sa présentation en juin 2005, d'une part car il constitue une expérience unique en France de mesure spatialisée de la diversité biologique des sols, et d'autre part car ses conclusions permettront d'orienter le choix des paramètres biologiques à mesurer ultérieurement sur le réseau.

Ce programme complète également deux actions menées par l'ADEME à savoir :

- le programme national ADEME "Bioindicateurs de qualité des sols" qui a besoin d'acquérir des données sur différentes composantes biologiques du sol, dans différents contextes, afin de constituer des référentiels d'interprétation des données acquises par différents bioindicateurs (ADEME, 2004)

- le programme européen ENVASSO² (ENVironmental ASsessment of Soil for mOnitoring) pour lequel l'ADEME est notamment chargée d'animer et de coordonner les actions concernant la mesure de la biodiversité des sols et son interprétation.

¹ <http://www.gissol.fr/index.php>

² <http://www.envasso.com/biodiversity.htm>

Le RMQS *BioDiv* vise à établir un premier référentiel de la composante biologique des sols et de son activité grâce à une caractérisation de l'ensemble de la biodiversité des sols ; ses différents objectifs sont :

- évaluer des paramètres définissant l'état de la biodiversité structurale et fonctionnelle
- étudier les relations possibles entre les paramètres définissant la qualité d'un sol et sa composante biologique
- pallier au manque d'outils de mesure des caractéristiques biologiques des sols

Ce programme est mené par l'UMR ECOBIO (Université de Rennes 1 / CNRS) et financé, en partie, par l'ADEME. Différents partenaires de toute la France (Rennes, Paris, Dijon, Montpellier, Nancy) se sont associés pour permettre cet inventaire de la biodiversité des sols bretons. Les groupes biologiques étudiés dans le cadre de ce programme sont : la macrofaune totale, les lombriciens, la mésofaune, les nématodes et la microbiologie. Ainsi, plusieurs échelles de taille d'organismes sont explorées (Figure 1).

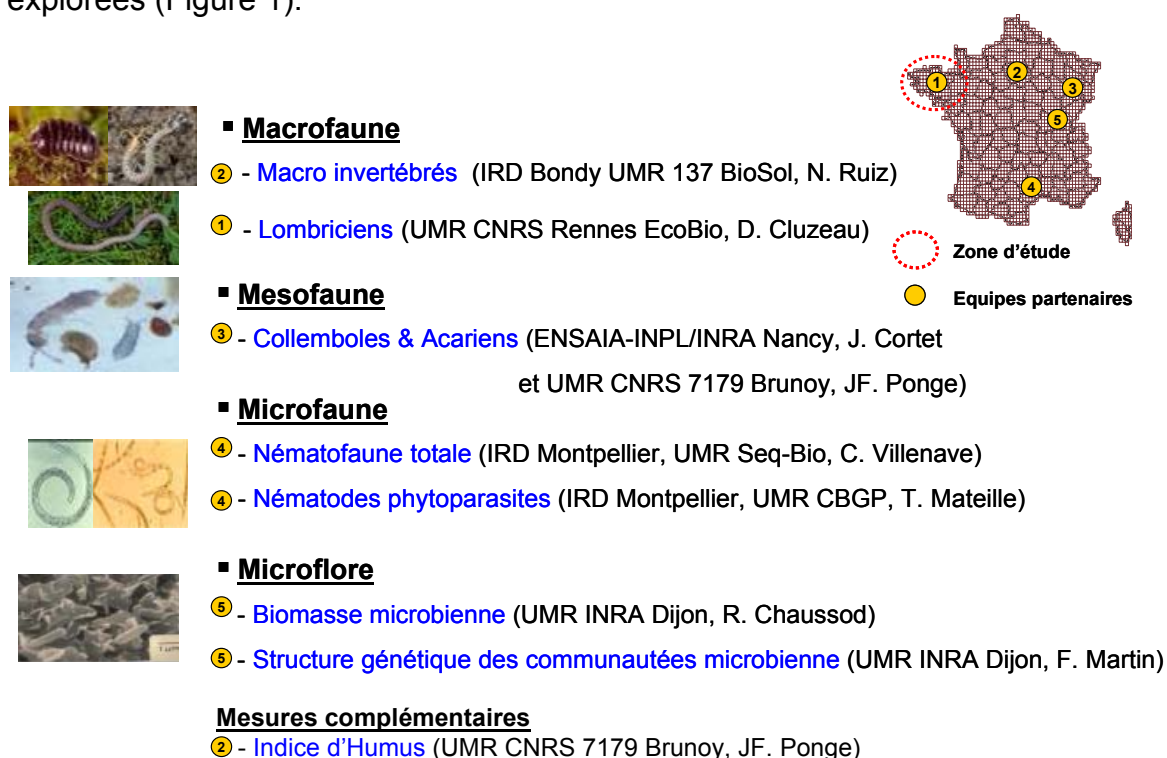


Figure 1 : Groupes biologiques étudiés et équipes partenaires associées du programme RMQS *BioDiv*

Ce tome présente les résultats de microbiologie. Il est constitué de trois parties. **La première partie** est consacrée à l'exploration de paramètres globaux et fonctionnels. Pour chacun des indicateurs biologiques utilisés, la distribution des valeurs est tout d'abord analysée. En cas de besoin, les données sont transformées pour remplir les conditions de normalité exigées par les analyses statistiques ultérieures. Enfin, les statistiques élémentaires sont présentées. **La deuxième partie** illustre les résultats de l'approche spatiale à l'échelle régionale afin de mettre en évidence, le cas échéant, une structuration spatiale des données. Dans **la troisième partie**, ces données microbiologiques sont mises en relation avec diverses variables explicatives, afin de rechercher d'éventuelles corrélations entre les valeurs mesurées et d'autres facteurs (caractéristiques physico-chimiques des sols, système de culture, pratiques culturelles...).

MATERIELS & METHODES

Méthodes de prélèvement et paramètres étudiés

Divers paramètres microbiologiques sont étudiés dans le cadre du programme RMQS *BioDiv*. Tout d'abord, la biomasse microbienne (**MOV et MOV%*Ct***) est déterminée par la méthode de fumigation-extraction (Chaussod *et al.*, 1988). Il s'agit d'une méthode aujourd'hui validée par la communauté scientifique et qui a donné lieu à une norme internationale (ISO 14-240.2).

Les communautés bactériennes telluriques sont également étudiées à l'aide de techniques basées sur l'extraction directe de l'ADN du sol selon la procédure décrite par Martin-Laurent *et al.* 2001 et en cours de normalisation auprès de l'ISO (texte ISO/CD 11063). Plusieurs analyses ont été conduites :

(i) L'abondance relative de la communauté globale bactérienne est déterminée par qPCR ciblant l'ADNr 16S de l'opéron ribosomique bactérien (**ADNr 16S**) à partir des extraits de l'ADN de sol

(ii) L'abondance relative des communautés bactériennes fonctionnelles impliquées dans la dénitrification (**narG**) et des communautés impliquées dans la dégradation du protocatechuate un intermédiaire clef de la voie des β -ceto adipates responsable de la biodégradation des composés phénoliques (**pcaH**), sont quantifiées.

(iii) La structure génétique de la communauté bactérienne globale est analysée par **B-ARISA** (Bacterial-Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, Ranjard *et al.*, 2003).

On dispose ainsi de paramètres globaux purement quantitatifs (biomasse microbienne) et, pour les populations bactériennes, d'une part de paramètres qualitatifs (B-ARISA), d'autre part de paramètres semi-quantitatifs portant sur l'abondance relative de gènes marqueurs de populations (ADNr 16S) ou de fonctions (narG et pcaH).

Nombre d'échantillons traités

Les données microbiologiques sont disponibles pour les 109 sites RMQS *BioDiv*. Deux sites ne sont pas clairement identifiés (666 et 829) pour les données qPCR.

Démarche d'exploitation des données

Les logiciels utilisés pour réaliser les analyses sont les suivants :

- XLStat (Version 2007.6 © 1995-2007 AddinSoft),
- Minitab (Version 12.2 © 1998 Minitab Inc),
- R (Version 2.8.0 (2008-10-20) © 2008 The R Foundation for Statistical Computing),
- ArcGis (Version 9.2 © 1999-2006 ESRI Inc.).

a) Exploration des données : analyses descriptives

Les statistiques descriptives et les représentations graphiques sous forme de boîtes à moustaches et d'histogrammes, permettent de caractériser chaque paramètre microbiologique. Ainsi, les valeurs moyenne, minimale, maximale et extrême³ sont identifiées. Des transformations (box-cox⁴) peuvent être réalisées pour normaliser les données. Pour l'étude des structures des communautés (bande B-ARISA), des analyses multivariées (Analyse en Composantes Principales : ACP sur matrice de covariance) sont réalisées.

³ Les valeurs extrêmes sont des valeurs exactes, mais considérées statistiquement comme anormalement faibles ou élevées. Elles sont représentées, dans les boîtes à moustaches, par deux symboles "*" et "o". Les valeurs "o" sont comprises dans l'intervalle [Q1 - 3 (Q3 - Q1); Q1 - 1.5 (Q3 - Q1)] ou [Q3 + 1.5 (Q3 - Q1); Q3 + 3 (Q3 - Q1)]. Les valeurs "*" correspondent à l'intervalle] Q1 - 3 (Q3 - Q1); Q3 + 3 (Q3 - Q1) [.

⁴ La transformation box-cox permet d'augmenter la normalité des données grâce à l'équation suivante :

$$F_{\lambda}(Y_t) = \begin{cases} (Y_t \lambda + 1)^{1/\lambda} & \lambda > 0 \\ \exp Y_t & \lambda = 0 \end{cases}$$

La valeur de Lambda peut être imposé ou optimisé avec le logiciel XLSTAT. L'optimisation est choisie car elle permet de maximiser la vraisemblance de l'échantillon, étant supposé qu'après transformation l'échantillon suit une loi normale.

b) Approche spatiale

La représentation cartographique permet une visualisation à l'échelle régionale des valeurs de chaque paramètre. Pour caractériser la structure spatiale des paramètres, le corrélogramme de l'indice de Moran (1948, 1950) est utilisé ainsi que l'analyse géostatistique (semi-variogramme) effectuée sur les paramètres qui suivent une distribution normale. La présence d'autocorrélation spatiale des taxons lombriciens a été testée par un test Join-Count (Dacey, 1968).

c) Relations avec les variables explicatives

Les liens avec les variables explicatives (paramètres physico-chimiques, occupation des sols, pratiques agricoles, données pédologiques, ...), obtenues dans le cadre du programme RMQS « classique » géré par l'unité Infosol d'Orléans, sont étudiés. Des tests de corrélation de Spearman ($\alpha = 0,05$) sont réalisés lorsque les variables explicatives sont quantitatives (ex : paramètres physico-chimiques). Lorsque les variables explicatives sont qualitatives, des tests non paramétriques de Kruskal-Wallis et Mann-Whitney sont effectués.

Les variables explicatives sont représentées sur le plan factoriel des observations (sites) de l'ACP afin de visualiser les groupes et leurs centres de gravité, regroupés par classe d'une variable catégorique (package `ade4` ; fonction : `s.class`). Le lien entre la structure des communautés et les variables explicatives est évalué par analyse de co-inertie (Dolédec & Chessel, 1994).

1. Exploration des données

1.1 Caractérisation globale : biomasse microbienne et abondance relative de gènes bactériens

1.1.1. Biomasse microbienne (MOV)

La biomasse microbienne fait référence à la fraction vivante de la matière organique, considérant l'ensemble des micro-organismes du sol comme un tout (Chaussod, 1996).

Les sols des sites RMQS *BioDiv* présentent des valeurs de biomasse microbienne (ou matière organique vivante : MOV) relativement élevées avec en moyenne 397 ± 265 mg C.kg⁻¹ de sol. Les valeurs varient fortement entre 129 (pour un site maraîcher du Finistère nord) et 1916 mg C.kg⁻¹ de sol. Cette forte hétérogénéité des valeurs est confirmée par le coefficient de variation qui est de 0,66 (Figure 2.1).

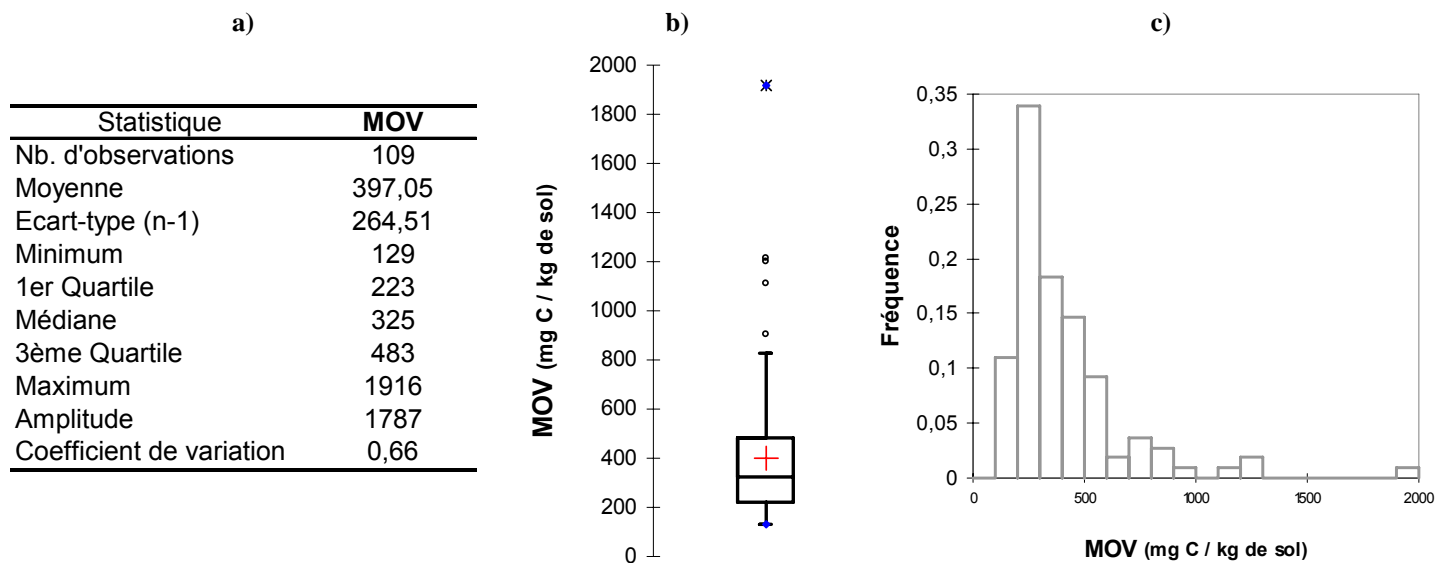
Au delà de 800 mg C.kg⁻¹ de sol les valeurs de MOV sont considérées statistiquement comme extrêmes. Ce type de valeurs, particulièrement élevées, est observé sur 5 sites. Il s'agit principalement de sites forestiers (719, 603, 664, 427) et d'un site prairial (671).

Les données brutes de MOV ne suivent pas une distribution normale. Seule une transformation box-cox ($\lambda = 0,01$) des données (sans les valeurs extrêmes : 104 sites) permet de respecter la condition de normalité.

Le coefficient de variation passe alors de 0,66 à 0,48.

1. Exploration des données

2.1 : Statistiques descriptives sur l'ensemble des 109 sites RMQS *BioDiv* (avec les valeurs extrêmes)



2.2 : Statistiques descriptives sans les sites qui présentent des valeurs extrêmes (N=104 sites)

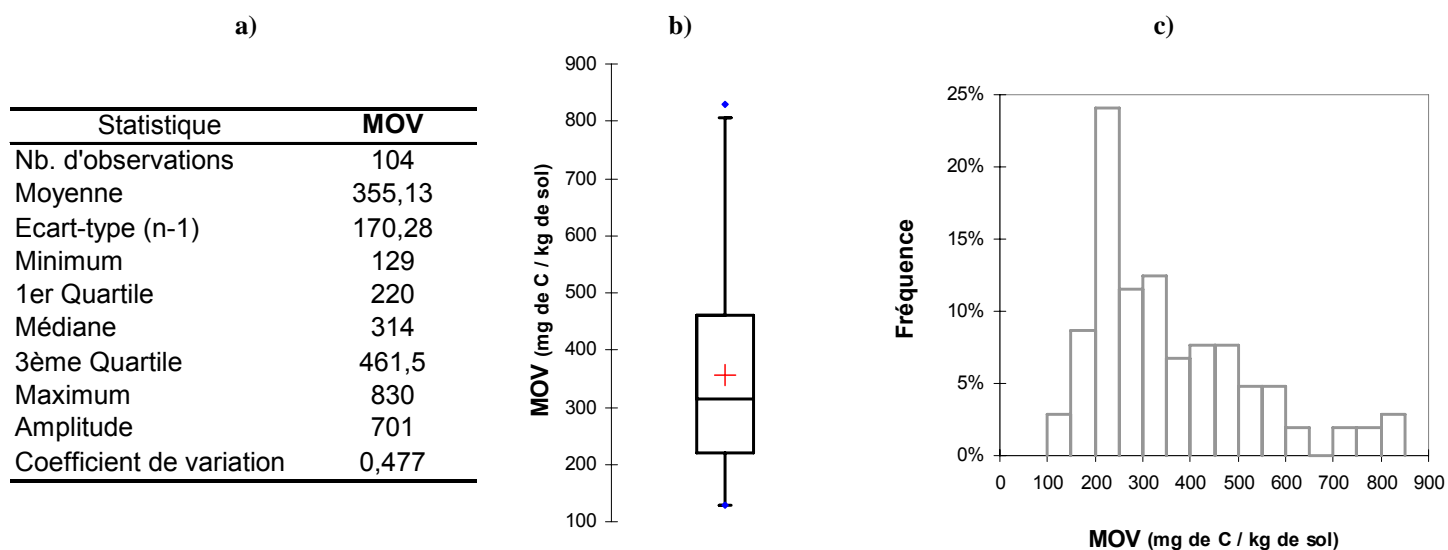


Figure 2 : Statistiques descriptives (a), boîtes à moustaches (b) et histogramme (c) des données de MOV

Ces données sont exprimées en mg de carbone par kg de sol.

(+ : la moyenne ; barre du milieu : la médiane ; ° et * : les valeurs extrêmes ; • : valeur minimale et maximale)

1.1.2. Biomasse microbienne par rapport au carbone total (MOV%*Ct*)

La biomasse microbienne peut également être exprimée en pourcentage du carbone total (MOV%*Ct*), ce qui permet une comparaison plus aisée de sols différents.

Le site dunaire 713 ne participe pas aux analyses car il présente une valeur de MOV%*Ct* particulièrement élevée (12,70) et qui peut être considérée comme anormale.

Sur les 108 sites RMQS *BioDiv*, la biomasse microbienne rapportée au carbone total est en moyenne de $1,58 \pm 0,77$. L'hétérogénéité entre les valeurs est assez faible puisque les valeurs s'étendent de 0,46 à 4,55. Trois sites forestiers 719, 611 et 664 présentent des valeurs au delà de la valeur limite de 3,2 (Figure 3).

Les données suivent une distribution normale lorsqu'une transformation box-cox (lambda = 0,01) est appliquée.

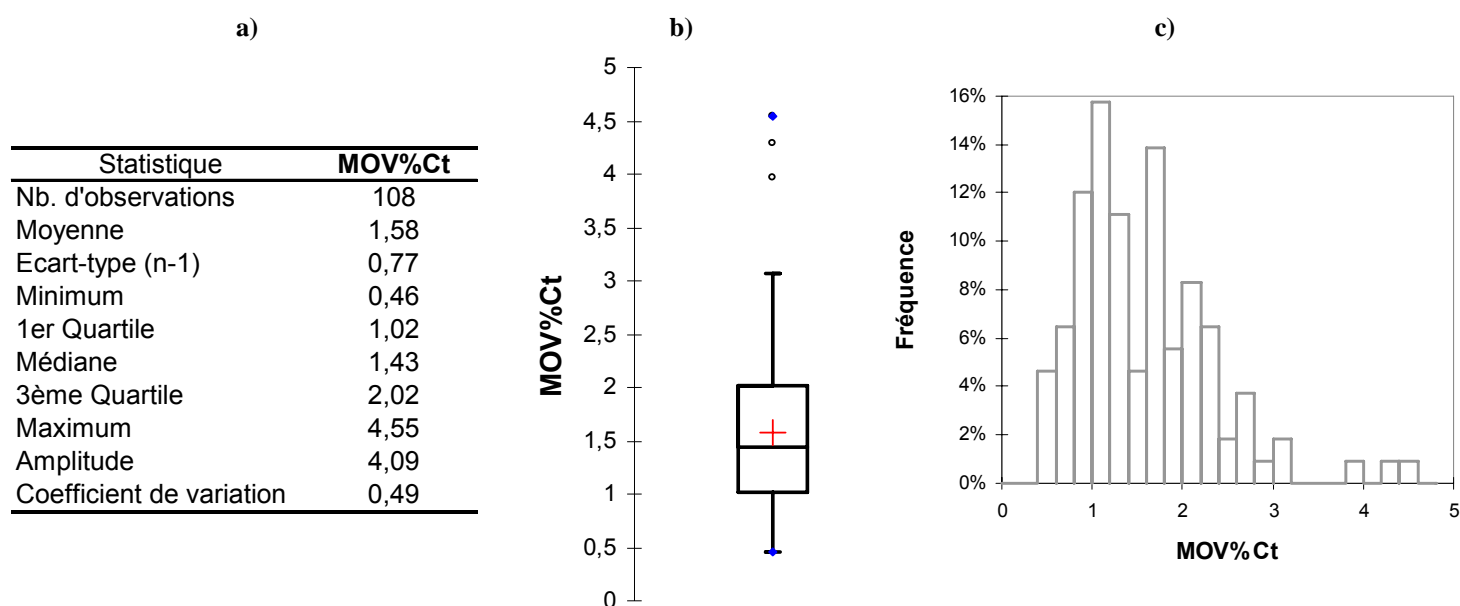


Figure 3 : Statistiques descriptives (a), boîtes à moustaches (b) et histogramme (c) des données de MOV%*Ct*

(+ : la moyenne ; barre du milieu : la médiane ; ° et * : les valeurs extrêmes ; ● : valeur minimale et maximale)

1.1.3. Abondance relative de gènes bactériens (ADNr 16 S)

L'abondance relative de la communauté bactérienne peut être estimée par une approche moléculaire consistant à extraire directement l'ADN du sol (Martin-Laurent *et al.* 2001) et à amplifier par PCR quantitative l'ADNr 16S de l'opéron ribosomique bactérien (Henry *et al.* 2004). Les sites RMQS *BioDiv* présentent une forte hétérogénéité des valeurs d'ADNr 16S. En effet, les valeurs observées s'étendent de $1,06 \times 10^2$ à $6,62 \times 10^5$ copies par nanogramme d'ADN de sol. Toutefois, ces valeurs sont conformes à celles déjà rapportées dans des sols Français (Lopez-Gutierrez *et al.* 2004). La valeur moyenne est de $9,12 \times 10^4 \pm 1,05 \times 10^5$ copies d'ADNr 16S / ng d'ADN de sol. Le coefficient de variation de l'abondance relative d'ADNr 16S dans les sols breton de 1,14 est assez élevé (Figure 4).

Les sites 418, 726, 432, 828 et 550 présentent des quantités d'ADNr 16 S élevées (au delà de $2,50 \times 10^5$ copies / ng d'ADN) considérées statistiquement comme valeurs extrêmes. L'interprétation possible de ces valeurs élevées pourrait être à mettre en relation avec la proximité maritime de ces sites (toujours à moins de 20 kilomètres des côtes).

Des valeurs d'ADNr 16S faibles (1 et $2,6 \times 10^2$ copies par nanogramme d'ADN) sont observées sur deux sites 656 et 665.

Les données brutes ne suivent pas une loi normale et aucune transformation des données n'est actuellement satisfaisante pour obtenir la normalité des données.

1. Exploration des données

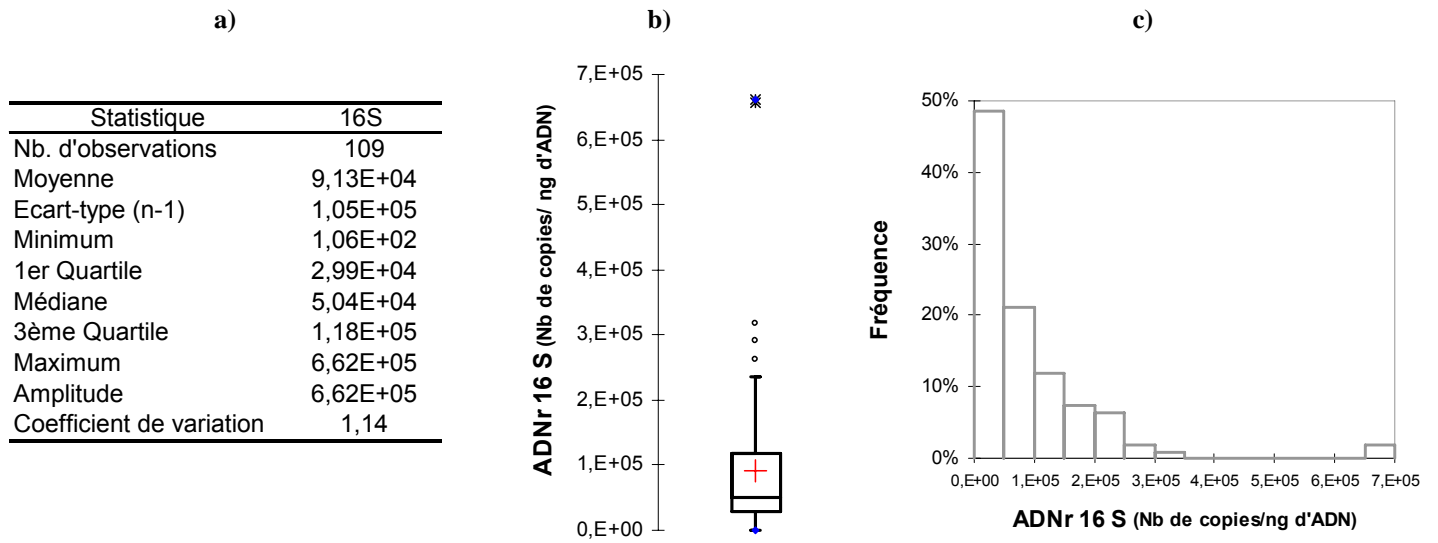


Figure 4 : Statistiques descriptives (a), boîtes à moustaches (b) et histogramme (c) des données qPCR ADNr 16S

Ces données sont exprimées en nombre de copies d'ADNr 16 S par nanogramme d'ADN de sol.
 (+ : la moyenne ; barre du milieu : la médiane ; ° et * : les valeurs extrêmes ; ● : valeur minimale et maximale)

1.2 Caractérisation fonctionnelle : abondance relative des communautés fonctionnelles *narG* et *pcaH*

La caractérisation de l'abondance relative des communautés bactériennes fonctionnelles est appréhendée par PCR quantitative à partir de l'ADN extrait directement du sol :

- ***narG*** impliqué dans la dénitrification (Henry *et al.* 2004)
- ***pcaH*** impliqué dans la dégradation du protocatechuate un intermédiaire métabolique de la voie des β -cetoalipates impliquée dans la biodégradation des composés phénoliques

1.2.1. Abondance relative de la communauté dénitrifiante (*narG*)

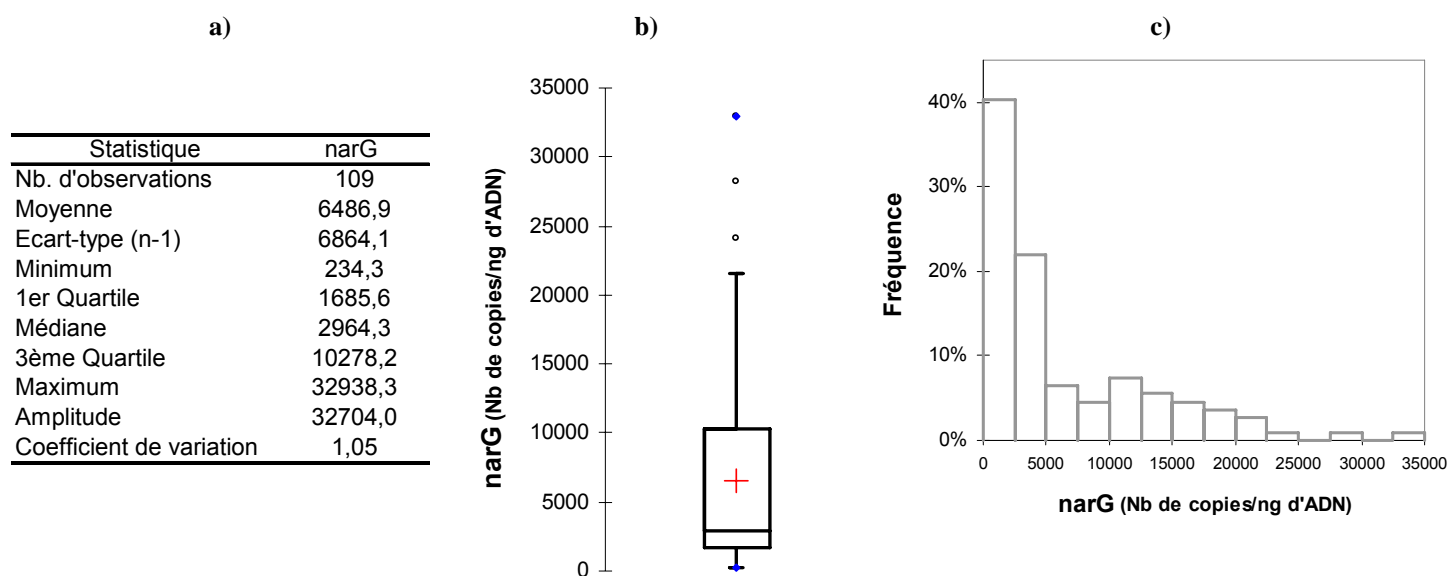
Les sites RMQS *BioDiv* présentent, en moyenne, des densités ***narG*** de $6,5 \times 10^3 \pm 6,9 \times 10^3$ copies / ng d'ADN. Les valeurs sont comprises entre $2,3 \times 10^2$ et $3,3 \times 10^4$ nombre de copies / ng d'ADN. Ces valeurs sont comparables à celles observées sur d'autres sols (Lopez-Gutierrez *et al.* 2004). Le coefficient de variation (1,05) est assez élevé (Figure 5.1).

Au delà de $2,2 \times 10^4$ copies du gène *narG* / ng d'ADN les valeurs sont considérées statistiquement comme extrêmes. Ce type de valeurs, particulièrement élevées, est observé sur 3 sites (670, 724 et 609).

Les données brutes ne suivent pas une loi normale et aucune transformation des données (racine carré, ln, box-cox, ...) ne permet actuellement de satisfaire la condition de normalité des données.

1. Exploration des données

5.1 : Statistiques descriptives sur l'ensemble des 109 sites RMQS *BioDiv* (« avec les valeurs extrêmes »)



5.2 : Statistiques descriptives sans les sites qui présentent des valeurs extrêmes (N=106 sites)

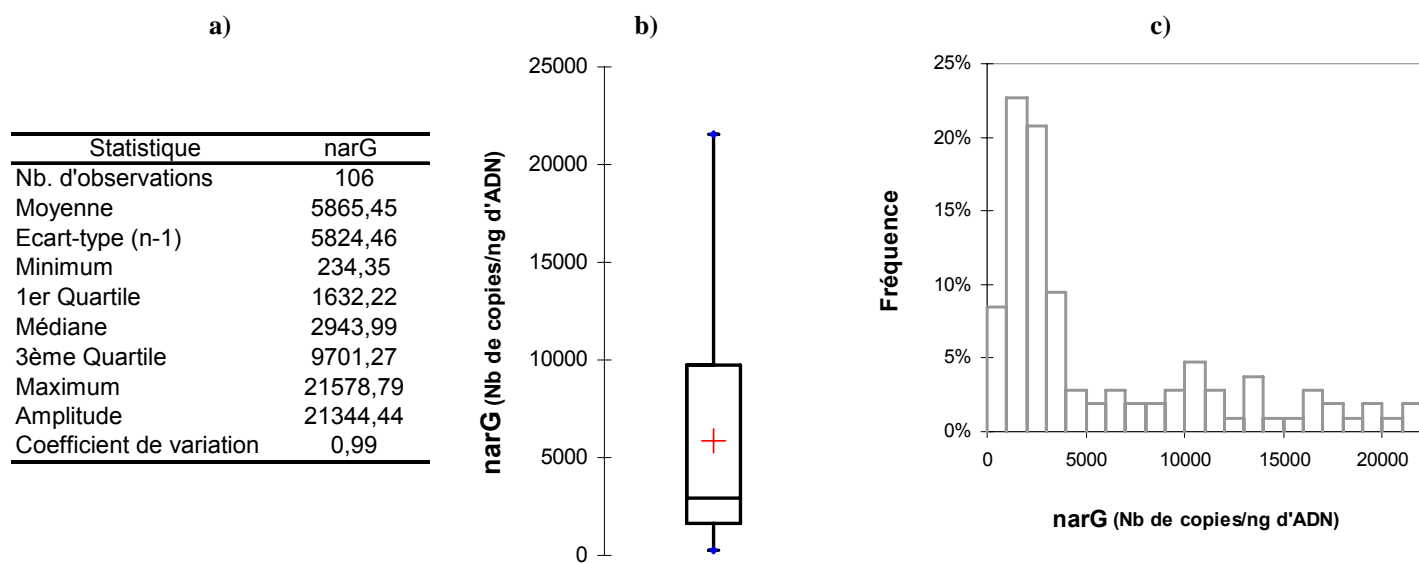


Figure 5 : Statistiques descriptives (a), boîtes à moustaches (b) et histogramme (c) de l'abondance des séquences narG dans l'ADN du sol

Ces données sont exprimées en nombre de copies du gène *narG* par nanogramme d'ADN de sol.
 (+ : la moyenne ; barre du milieu : la médiane ; ° et * : les valeurs extrêmes ; ● : valeur minimale et maximale)

1.2.2. Ratio narG/16S

L'abondance relative de la communauté dénitrifiante par rapport à la communauté bactérienne globale peut-être estimée par le calcul du ratio narG/16S. Cette abondance relative renseigne en quelque sorte de la richesse spécifique du sol en communauté dénitrifiante.

Les sites RMQS *BioDiv* présentent des valeurs de ratio narG/16S comprises entre 0,002 et 0,32. Ces valeurs sont dans l'ordre de grandeur de celles observées précédemment pour des sols Français (Lopez-Gutierrez *et al.* 2004). Le ratio moyen observé est de $0,082 \pm 0,055$. Le coefficient de variation est de 0,67 (Figure 6).

Notons que les deux sites 665 et 656 présentant des ratios extrêmement élevés, de 4,9 et 27,7, ne participent pas aux analyses. Notons que des valeurs anormalement faibles du nombre de copies du gène ADNr16S avaient été enregistrées sur les échantillons de sol provenant de ces deux sites. Des ratios élevés sont également observés sur les sites 548, 602 et 424 (respectivement 0,217, 0,266, et 0,318).

Les données brutes du ratio narG/16S ne suivent pas une distribution normale. Une transformation box-cox des données ($\lambda = 0,267$) permet de remplir la condition de normalité. Pour cela, les sites 665 et 656 ne sont pas pris en compte. Il ne reste donc que 107 sites étudiés.

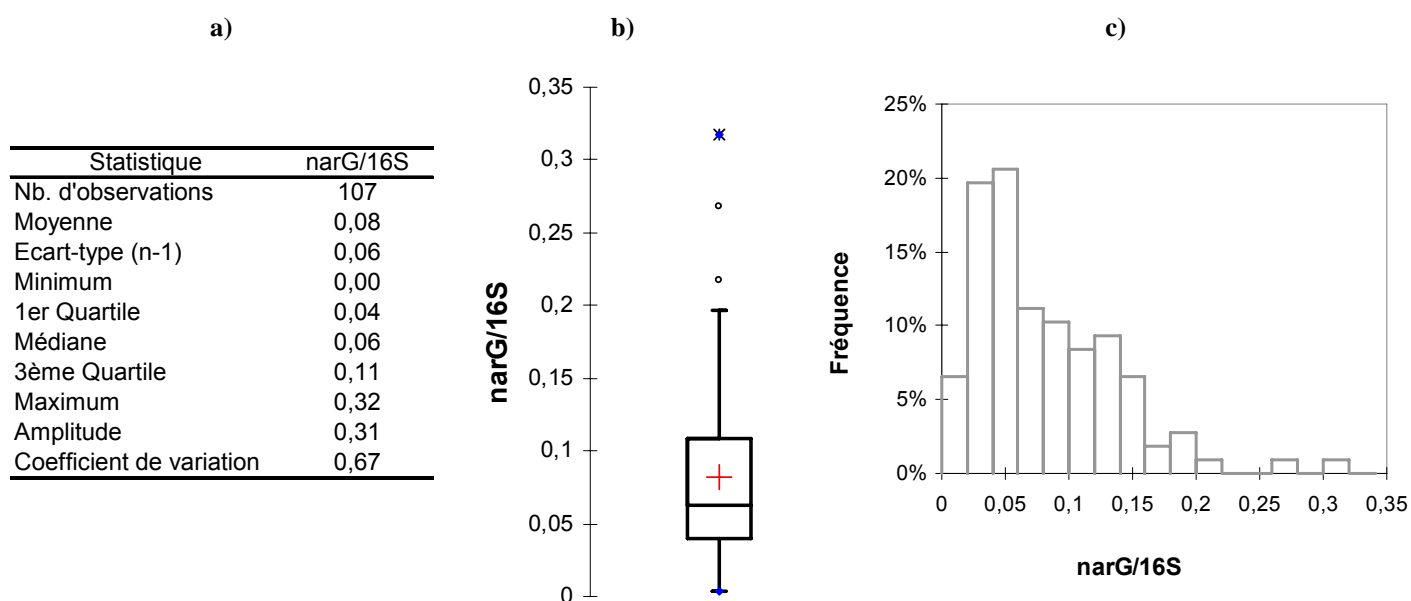


Figure 6 : Statistiques descriptives (a), boîtes à moustaches (b) et histogramme (c) du ratio narG/16S

Ces données sont exprimées en pourcentage

(+ : la moyenne ; barre du milieu : la médiane ; ° et * : les valeurs extrêmes ; • : valeur minimale et maximale)

1.2.3. *pcaH*

L'abondance de la communauté bactérienne dégradant le protocatechuate a été estimée par qPCR à partir de l'ADN extrait directement des sites du RMQS *BioDiv*.

Les sites RMQS *BioDiv* présentent des valeurs de densité de *pcaH* comprises entre $6,5 \times 10^1$ et $1,5 \times 10^4$ copies du gène / ng d'ADN de sol. A titre de comparaison, des valeurs de 10^3 à 10^4 copies de *pcaH* par ng d'ADN ont été trouvées par El Azhari *et al.* (2008). En moyenne, on retrouve $3,9 \times 10^3 \pm 2,8 \times 10^3$ copies / ng d'ADN de sol. Le coefficient de variation de 0,71 est moyennement élevé. Deux sites (312 et 597) présentent des valeurs élevées, au-delà de $1,15 \times 10^4$ nombre de copies de *pcaH* / ng d'ADN de sol, considérées statistiquement comme extrêmes (Figure 7). La proximité avec l'océan constitue un des points communs de ces deux sites.

Les données brutes ne suivent pas une loi normale mais les données qui subissent une transformation racine carré ou box-cox ($\lambda = 0,42$) sont normales.

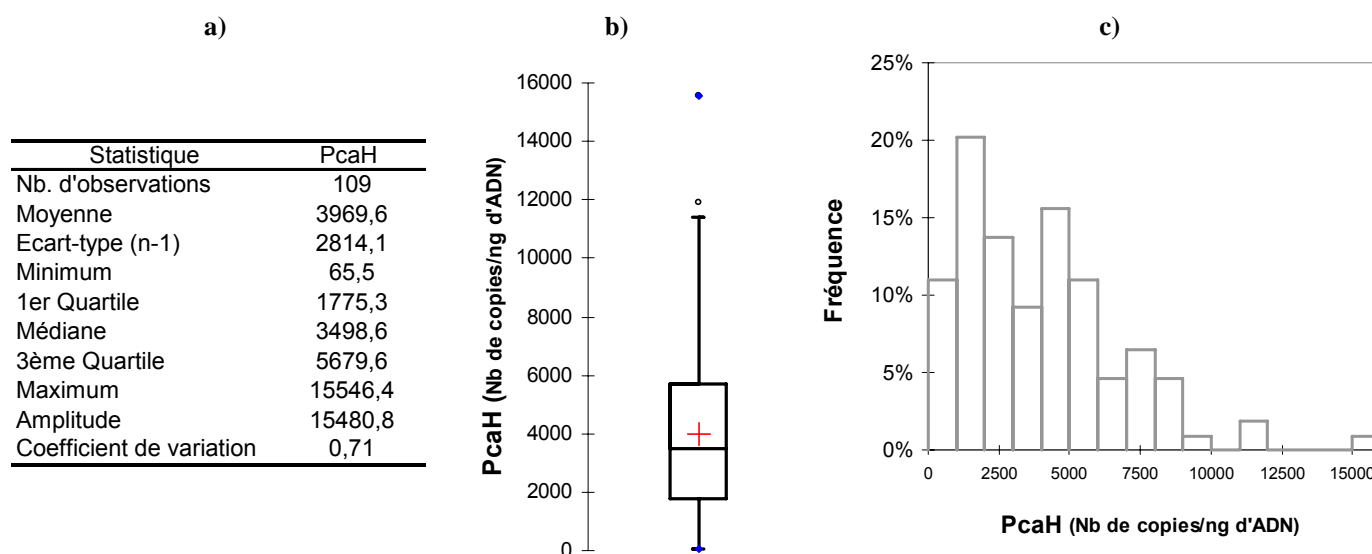


Figure 7 : Statistiques descriptives (a), boîtes à moustaches (b) et histogramme (c) des données qPCR *pcaH*

Ces données sont exprimées en nombre de copies du gène *pcaH* par nanogramme d'ADN de sol.
 (+ : la moyenne ; barre du milieu : la médiane ; ° et * : les valeurs extrêmes ; ● : valeur minimale et maximale)

1.2.4. Ratio *pcaH*/16S

L'abondance relative de la communauté dégradant le protocatechuate par rapport à la communauté bactérienne globale peut-être estimée par le calcul du ratio *pcaH*/16S. Cette abondance relative renseigne en quelque sorte de la richesse spécifique du sol dans la communauté dégradant des composés phénoliques.

Les sites RMQS *BioDiv* présentent des valeurs de ratio *pcaH*/16S comprises entre 0,002 et 0,188. Le ratio moyen observé est de $0,06 \pm 0,04$. Le coefficient de variation est de 0,6 (Figure 8). Les valeurs observées ici sont en bonne cohérence avec les valeurs publiées par El Azhari *et al.* (2008), qui se situaient entre 0.002 et 0.109.

Des valeurs légèrement élevées, entre 0,162 et 0,188, sont observées sur quatre sites (780, 661, 482, 597). Notons que trois sites sont exclus de l'analyse en raison de valeurs du ratio sont très élevées. Il s'agit des sites 656, 665 et 421 qui présentent respectivement des valeurs de 17,8, 0,405 et 0,459. Rappelons que pour les deux premiers sites, des valeurs anormalement faibles du nombre de copies du gène ADNr 16S avaient été trouvées.

Les données brutes du ratio *pcaH*/16S ne suivent pas une distribution normale. Une transformation box-cox des données ($\lambda = 0,357$) permet d'obtenir la normalité des données avec 106 sites. Les sites 656, 421 et 665 sont écartés.

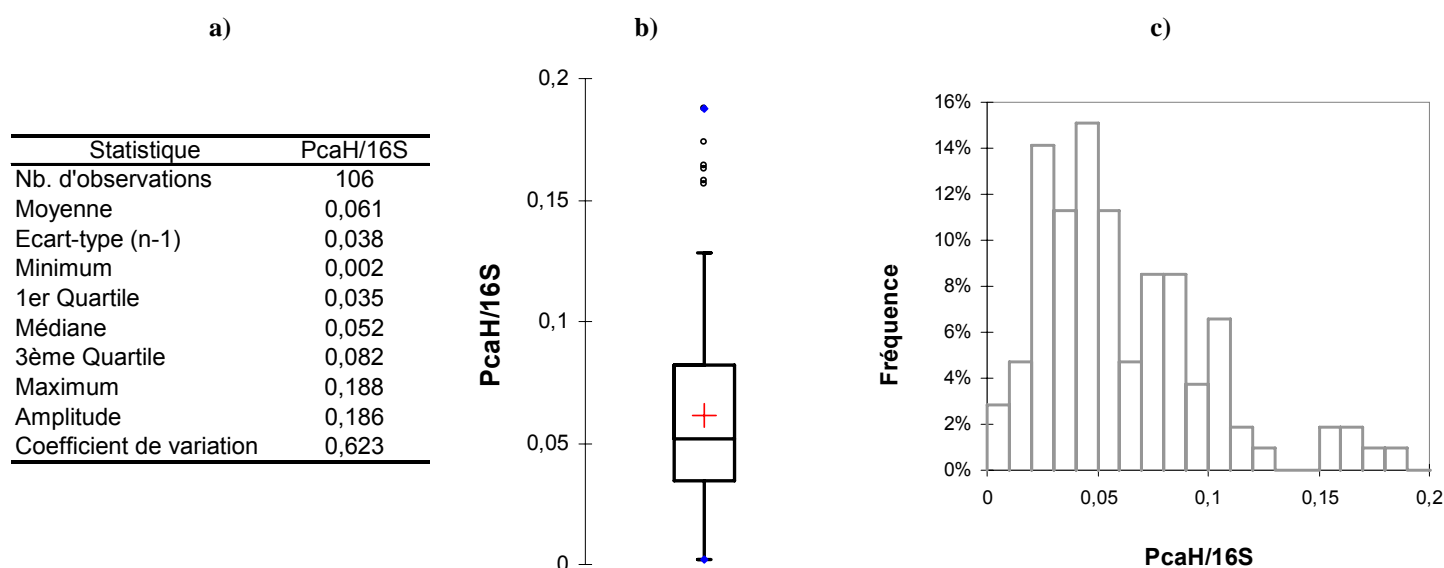


Figure 8 : Statistiques descriptives (a), boîtes à moustaches (b) et histogramme (c) du ratio *pcaH*/16S

Ces données sont exprimées en pourcentage

(+ : la moyenne ; barre du milieu : la médiane ; ° et * : les valeurs extrêmes ; ● : valeur minimale et maximale)

1.3 Caractérisation de la structure génétique des communautés bactériennes

La caractérisation de la structure génétique des communautés bactériennes est réalisée grâce à la méthode B-ARISA (Bacterial-automated ribosomal intergenic spacer analysis) (Ranjard *et al.*, 2000). Cette technique fournit des empreintes génétiques complexes du type code barres, révélant la structure de la communauté bactérienne globale.

Une analyse en composantes principales (ACP) est réalisée sur la matrice de covariance (n-1) des 341 bandes RISA sur les 109 sites RMQS *BioDiv*. Les trois premiers axes permettent d'extraire 43,4% de l'inertie totale de ce tableau, respectivement 23,9% pour l'axe 1, 13,6% pour l'axe 2 et 5,7% pour l'axe 3 (Figure 9).

Les variables V45, V46 et V76 se détachent particulièrement du nuage de points. Elles sont liées respectivement au site 826, 598 pour l'axe1 et 421 pour l'axe 2.

1. Exploration des données

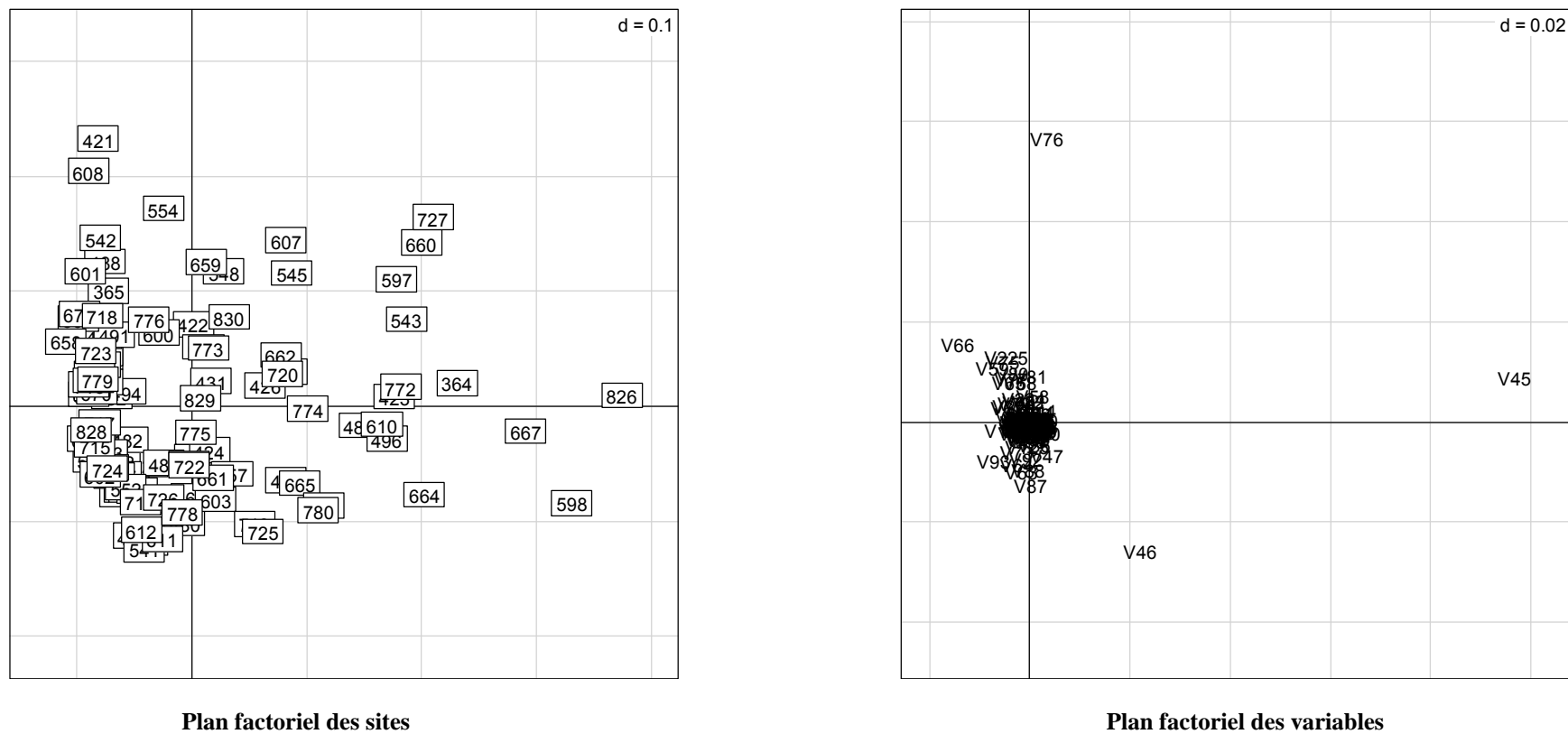


Figure 9 : Plan factoriel (1-2) de l'ACP sur la matrice de covariance des données B-ARISA

1.4 Lien entre les paramètres microbiologiques

Il existe des liens entre les paramètres microbiologiques mesurés sur les sites RMQS *BioDiv*. Le test de corrélation de Spearman permet d'appréhender ces relations. Les résultats sont illustrés par la matrice de corrélation (Tableau 1) et les nuages de points (Figure 10).

Des corrélations assez significatives (supérieur à 0,6) sont retrouvées entre l'ADNr 16S et *narG*, entre l'ADNr 16S et *pcaH* et entre *narG* et *pcaH* (Tableau 2). La corrélation entre MOV et MOV%*Ct*, est en partie attendue puisque MOV%*Ct* est un ratio calculé à partir des données MOV. Toutefois, les MOV ne sont pas proportionnelles à *Ct* mais « plus que proportionnelles » ; à des valeurs absolues élevées de MOV sont généralement associées des valeurs relatives (en % *Ct*) élevées. Le niveau de MOV s'avère donc plus discriminant que *Ct* pour la caractérisation des sols au plan biologique. De manière générale, il n'existe pas de lien entre les paramètres de biomasse microbienne et les paramètres obtenus par la qPCR. La raison en est que la première est exprimée sur la base d'une masse de sol sec alors que les seconds sont exprimés par rapport à une quantité d'ADN extrait.

1. Exploration des données

Tableau 1 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres microbiologiques (N=109)

Variables	MOV	MOV%Ct	16 S	narG	narG/16S	PcaH
MOV%Ct	0,660					
16 S	0,145	0,196				
narG	0,111	0,209	0,755			
PcaH	0,098	0,055	0,670	0,680		
narG/16S	0,002	0,079	-0,174	0,454	0,069	
PcaH/16S	-0,045	-0,162	-0,550	-0,271	0,271	0,144

Les valeurs en gras sont significativement différentes de 0 à un niveau de signification $\alpha=0,05$

Tableau 2 : R, p value et R² des corrélations les plus significatives

	R	p	R ²
MOV et MOV%Ct (N = 107)	0,641	< 0,0001	0,411
ADNr 16 S et narG (N = 109)	0,755	< 0,0001	0,569
ADNr 16 S et PcaH (N = 109)	0,670	< 0,0001	0,449
narG et PcaH (N = 109)	0,680	< 0,0001	0,463

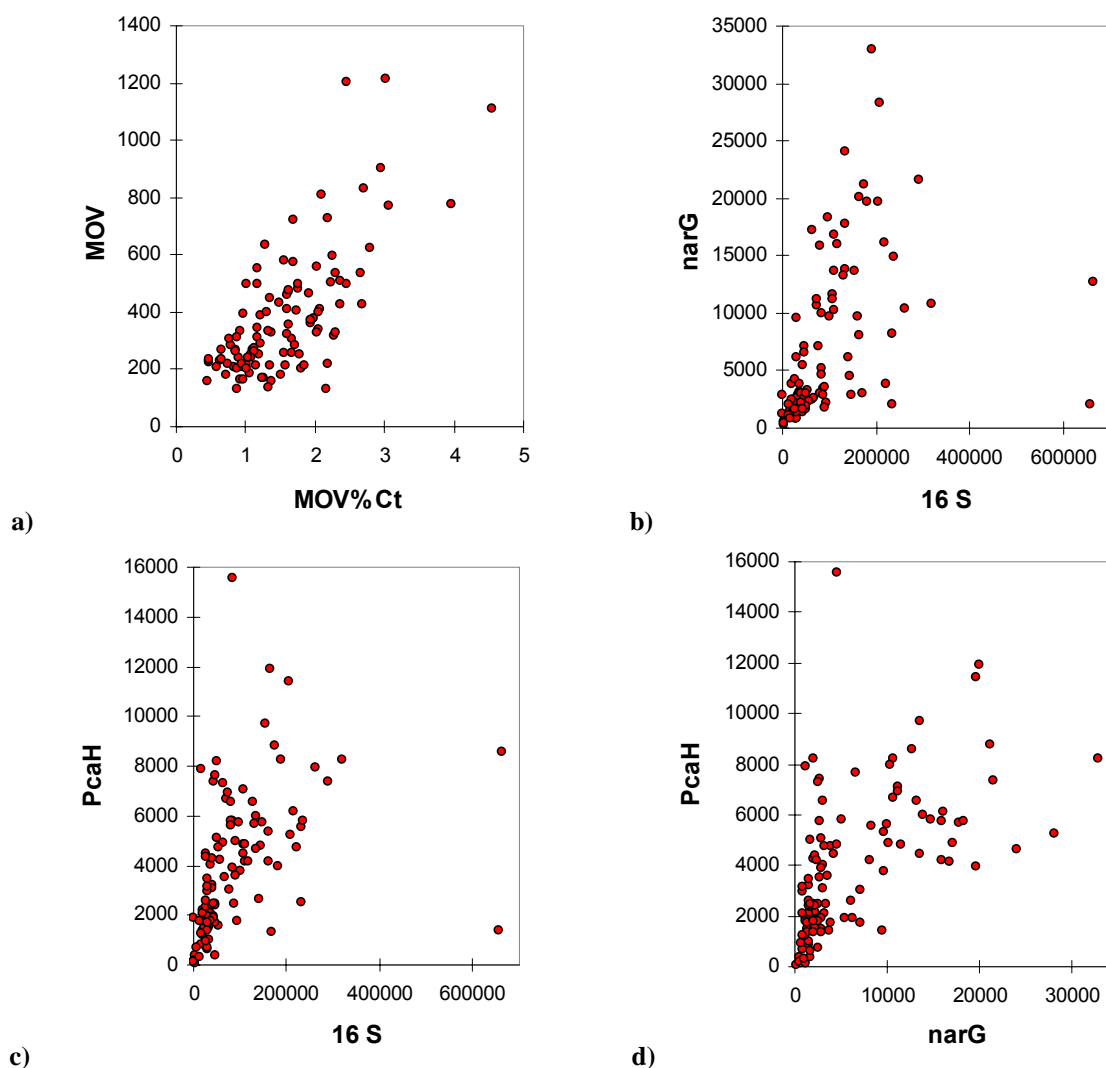


Figure 10 : Nuages de points des corrélations les plus significatives entre paramètres microbiologiques

a) MOV et MOV%Ct ; b) ADNr 16S et *narG* ; c) ADNr 16S et *pcaH* ; d) *narG* et *pcaH*

2. Approche spatiale

2.1 Structuration spatiale des paramètres microbiologiques

Les valeurs de biomasse microbienne (MOV et MOV%*Ct*) sont représentées spatialement sous forme de cartes (Figure 12 et 13). Cette représentation ne permet pas d'identifier visuellement des patterns spatiaux à l'échelle régionale pour la MOV. Ceci est probablement dû au fait que d'autres facteurs interviennent de façon prépondérante, tel que l'usage des sols (cultures, prairies, forêts) ou d'autres facteurs anthropiques, ou des propriétés de sols variant à une échelle autre que celle de l'échantillonnage. En revanche pour le paramètre MOV%*Ct*, il semble que les valeurs soient un peu plus importantes en Ille-et-Vilaine. De fait, des études antérieures ont montré que les sols du Finistère sont globalement plus riches en matière organique. Ceci est en partie lié aux types de sols majoritairement rencontrés : beaucoup de sols sur schistes dans le Finistère ; sols limoneux du bassin de Rennes (Walter *et al.*, 2004).

Les données box-cox transformées (Annexe I) ont été utilisées pour réaliser les analyses de géostatistiques (semi-variogramme), qui nécessitent une distribution normale des données. Le site insulaire d'Ouessant (n° 418) ne participe pas aux analyses.

Tableau 3 : Synthèse des résultats géostatistiques pour les paramètres microbiologiques.

Paramètres microbiologiques	Indice de moran	p.value	P value de permutation	Significativité du corrélogramme	Significativité du variogramme
Paramètres globaux					
MOV	0,0385	0,2298	0,2243	ns	ns
MOV% <i>Ct</i>	0,0632	0,1307	0,1353	ns	ns
ADNr 16 S					
Paramètres fonctionnels					
narG					
narG/16S	-0,0965	0,9115	0,9129	ns	ns
pcaH	-0,0571	0,7712	0,7658	ns	ns
pcaH/16S	-0,0839	0,8745	0,8696	ns	ns

L'existence de structuration spatiale à l'échelle régionale n'est pas mise en évidence pour la biomasse microbienne (MOV). Lorsque cette biomasse est exprimée par

2. Approche spatiale

rapport au carbone total, deux points sont significatifs à faible distance dans le corrélogramme (Figure 11). Cependant, le corrélogramme pris dans son ensemble n'est pas significatif (Tableau 3).

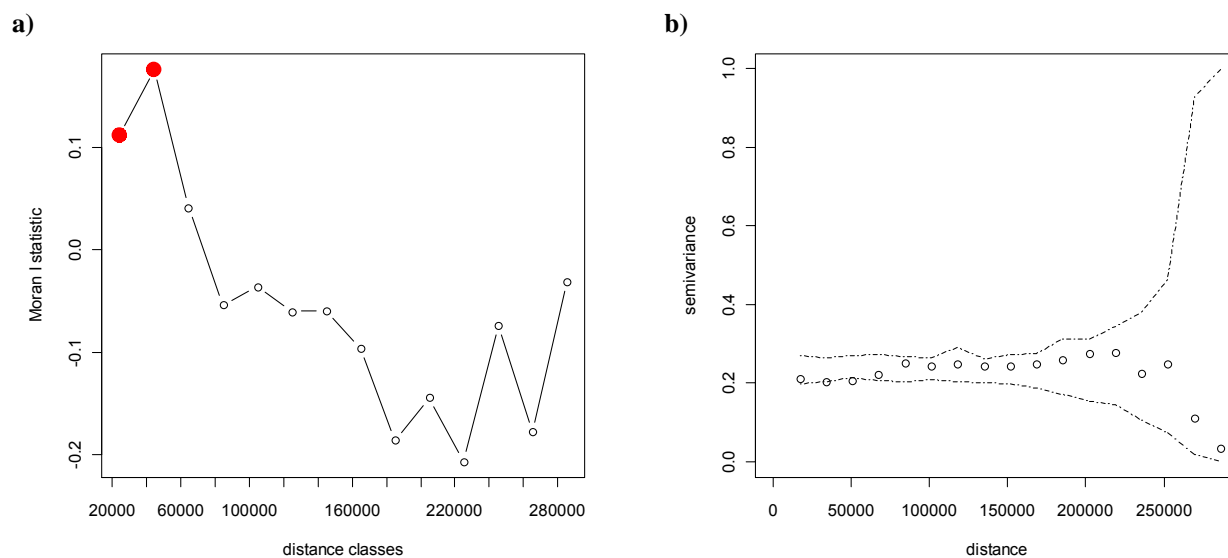


Figure 11 : Corrélogramme (a) et variogramme (b) de la biomasse microbienne (MOV%Ct)

Biomasse microbienne sur les sites RMQS *BioDiv*

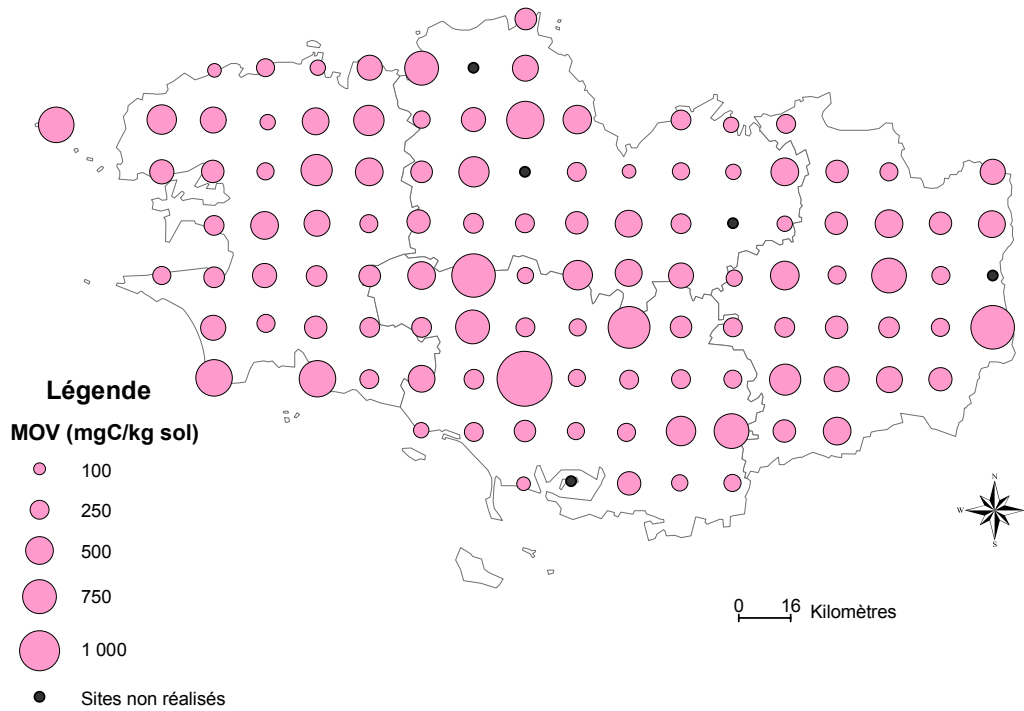


Figure 12 : Carte de la biomasse microbienne

Biomasse microbienne rapporté au carbone total sur les sites RMQS *BioDiv*

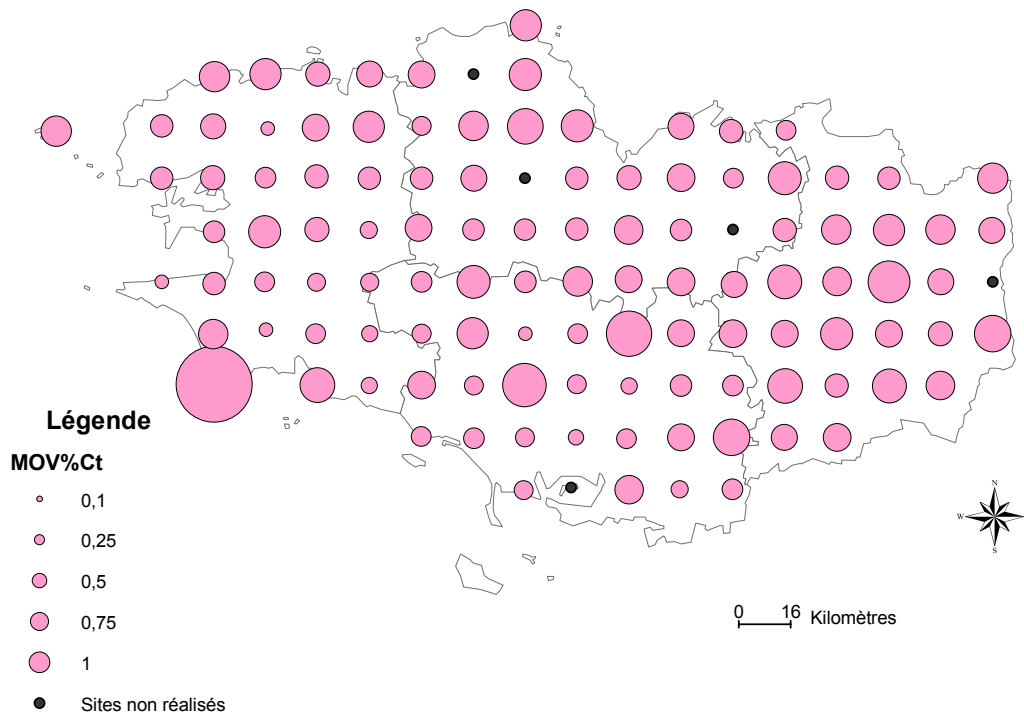


Figure 13 : Carte de la biomasse microbienne (exprimée en pourcentage du carbone total)

2. Approche spatiale

L'abondance de la communauté bactérienne globale estimée par qPCR ciblée sur l'ADNr 16S de l'opéron ribosomique bactérien déterminé dans l'ADN du sol extrait des échantillons du RMQS *BioDiv* (ADNr 16S) est représenté spatialement sous forme de cartogramme (Figure 14). Comme les données ne suivent pas une distribution normale et qu'aucune transformation des données n'a permis de remplir cette condition, les analyses géostatistiques n'ont pu être réalisées pour ce paramètre.

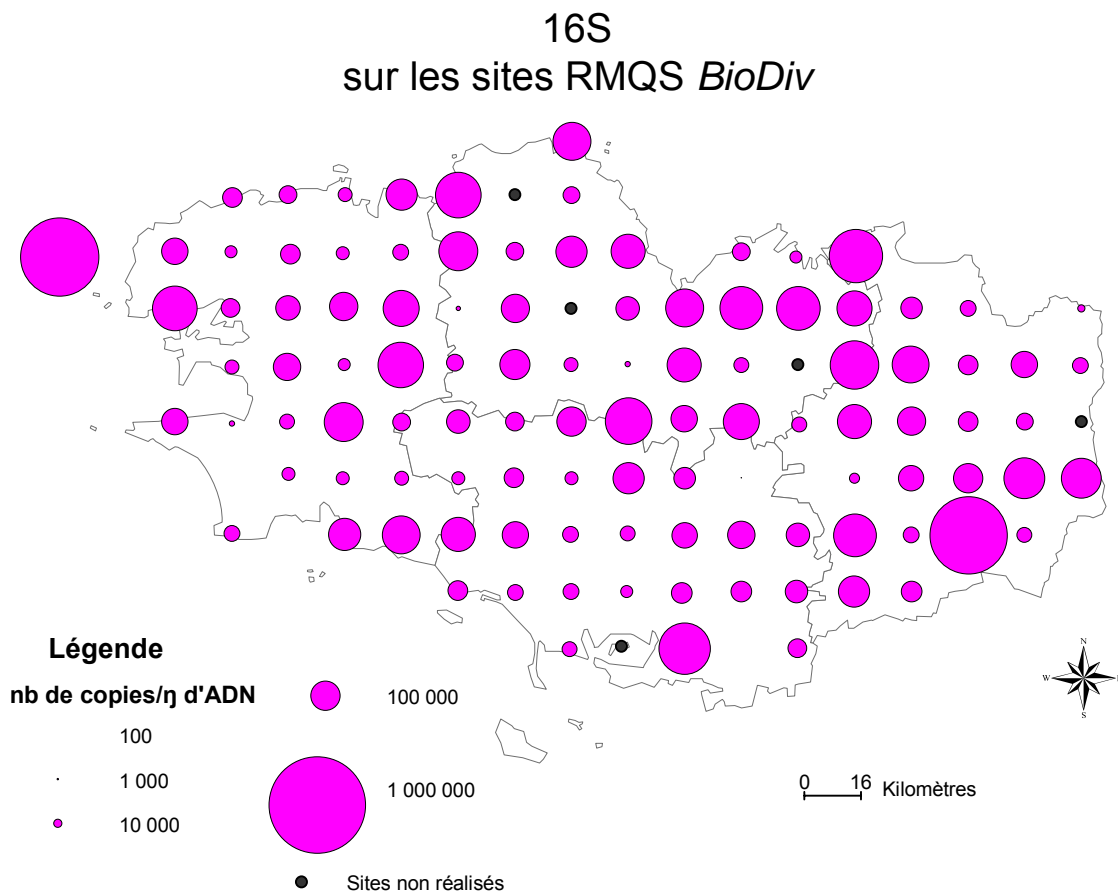


Figure 14 : Carte du nombre de copies de l'ADNr 16 S par ng d'ADN du sol

2.2 Structuration spatiale des communautés bactériennes fonctionnelles

Les paramètres caractérisant l'abondance relative de communautés bactériennes fonctionnelles impliquées dans la dénitrification et la biodégradation du protocathechuate quantifiée par qPCR à partir de l'ADN de sol sont présentés spatialement sous la forme de cartes (Figures 16a et 17a respectivement pour narG et pcaH). Le ratio de l'abondance de ces gènes de fonction rapportée à l'abondance du gène ADNr 16S est également représenté sous la forme de cartes (Figures 16b et 17b). Visuellement, on ne distingue pas de patterns spatiaux à l'échelle régionale pour ces paramètres.

Les analyses géostatistiques ont été conduites uniquement sur les données qui suivent une distribution normale. Il s'agit de :

- pcaH (transformation box-cox) sur 109 sites
- ratio pcaH/16S (transformation box-cox) sur 106 sites
- ratio narG/16S (transformation box-cox) sur 107 sites

Les outils géostatistiques, corrélogramme de l'indice de Moran et semi-variogramme, ont été utilisés afin de mettre en évidence l'existence ou non de structuration spatiale. Les résultats des corrélogrammes et semi-variogrammes (Tableau 3) confirme le constat qu'il n'existe pas de structuration spatiale des valeurs de pcaH (Figure 15), de ratio pcaH/16S et narG/16S à l'échelle régionale.

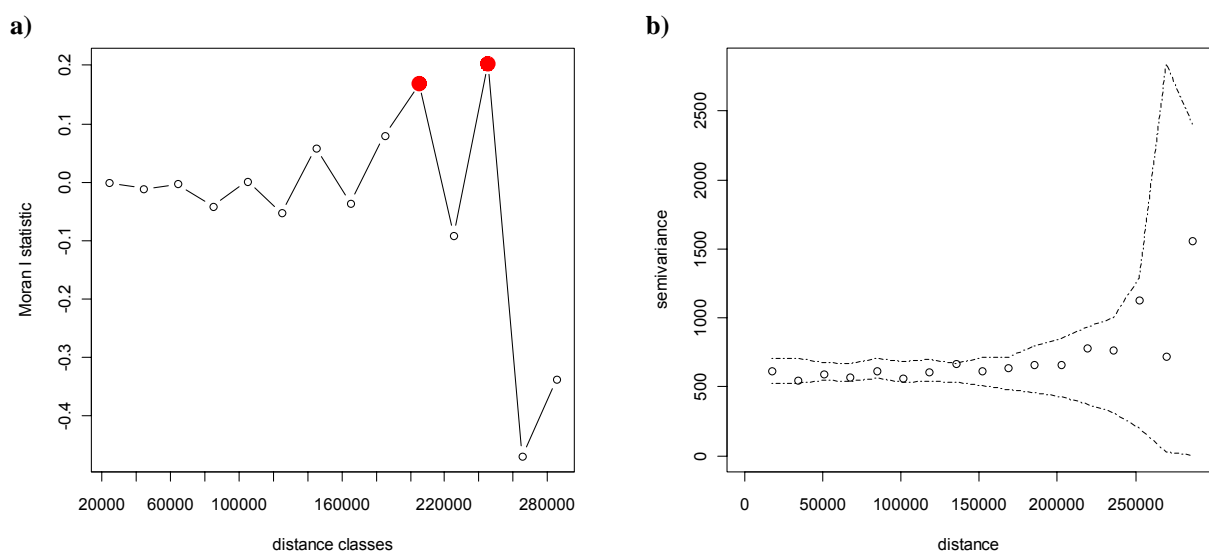
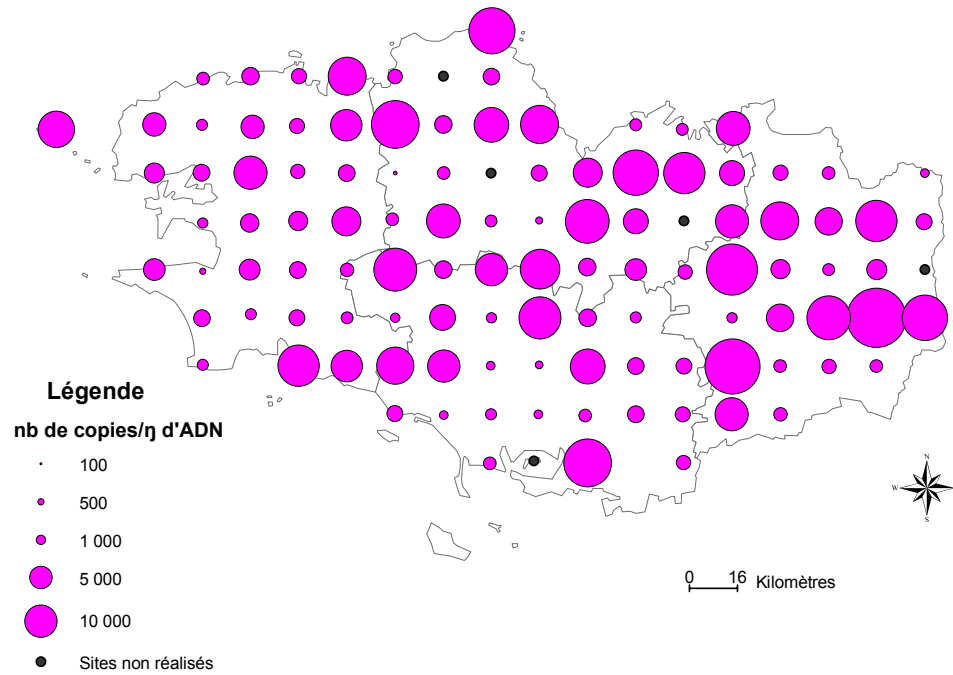


Figure 15 : Corrélogramme (a) et variogramme (b) de pcaH

2. Approche spatiale

a)

narG
sur les sites RMQS *BioDiv*



b)

Ratio narG/16S
sur les sites RMQS *BioDiv*

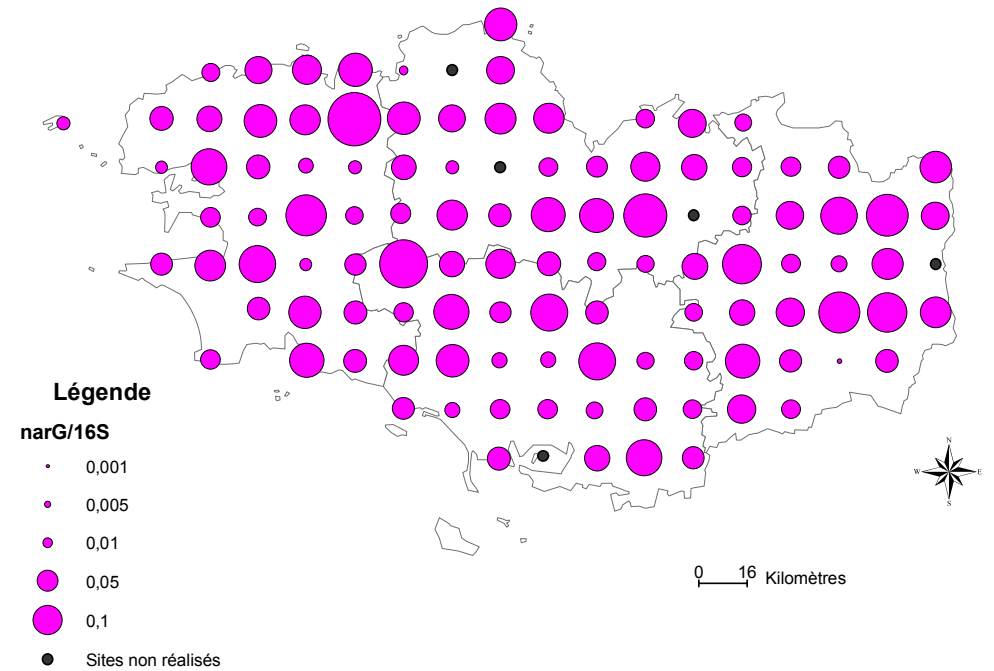
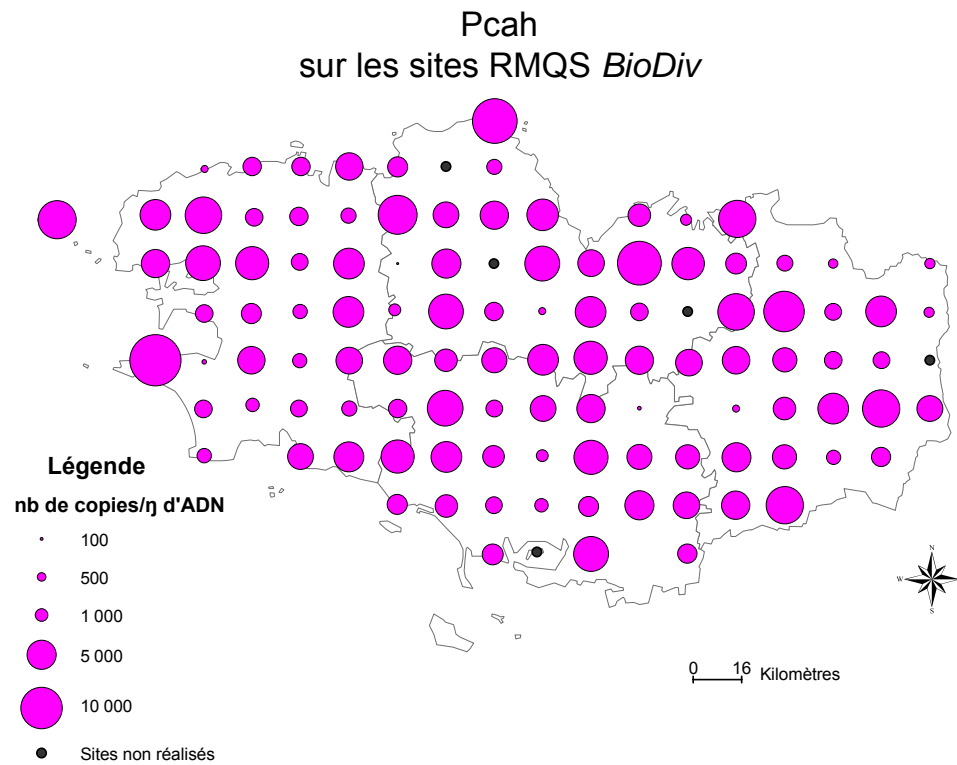


Figure 16 : Carte du nombre de copies de *narG* par ng d'ADN du sol (a) et du ratio *narG*/ADNr 16S (b)

2. Approche spatiale

a)



b)

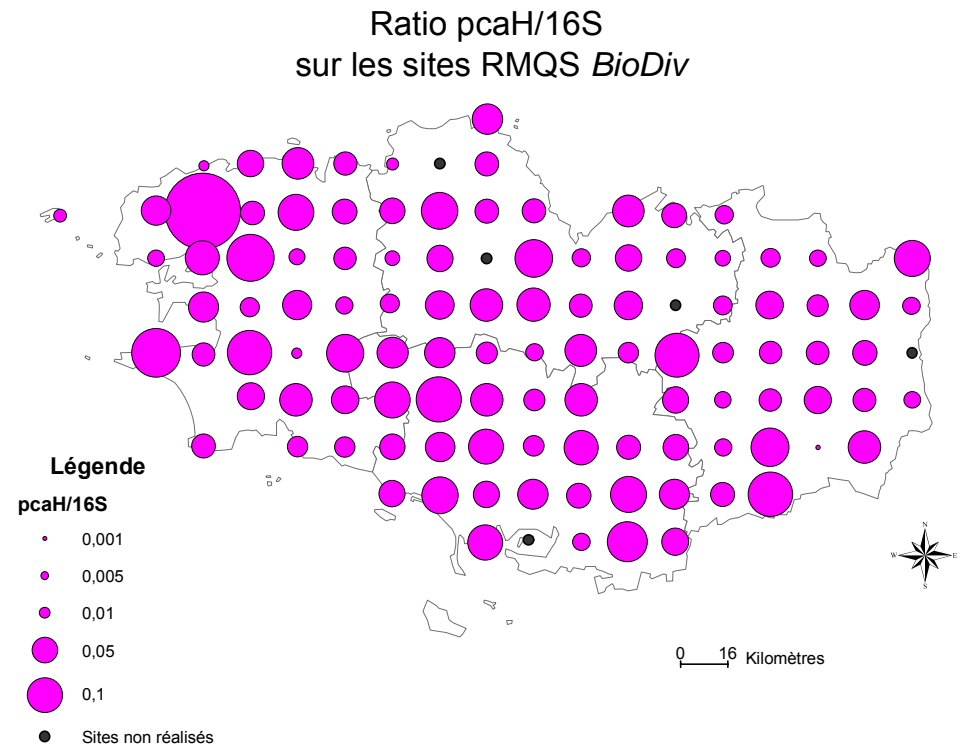


Figure 17 : Carte du nombre de copies de *pcaH* par ng d'ADN de sol (a) et du ratio *pcaH*/ADNr 16S (b)

3. Données microbiologiques et variables explicatives

3.1 Paramètres globaux et fonctionnels en lien avec les variables explicatives

3.1.1 Paramètres microbiologiques et paramètres physico-chimiques

Les paramètres microbiologiques ont été confrontés aux résultats d'analyses physico-chimiques des sites RMQS. Il existe plusieurs outils statistiques qui permettent d'étudier ce lien tels que les corrélations de Spearman ($\alpha = 0,05$).

La biomasse microbienne (MOV) est corrélée négativement avec le phosphore assimilable alors qu'elle est corrélée positivement avec le carbone et l'azote (Figure 18). La MOV exprimée en pourcentage de carbone total (MOV%*Ct*) présente plus de corrélations significatives avec les éléments physico-chimiques. En effet des corrélations négatives sont également retrouvées avec le phosphore assimilable mais également avec le thallium et le plomb total (Figure 19). Pour ce qui concerne le phosphore (P_{ass}), la relation négative peut s'expliquer par des niveaux élevés de biomasse microbienne dans les sols « naturels », pauvres en P. En ce qui concerne le thallium et le plomb, diverses hypothèses (non exclusives) peuvent être avancées : lien avec le type pédologique, sols contaminés, etc.

Figure 18 : Corrélations significatives entre biomasse microbienne et paramètres physico-chimiques
a) tableau des corrélations significatives et b) illustrations des corrélations les plus significatives ($p < 0,0001$)
MOV (N = 109)

a)

<i>MOV</i>	Variables	R	p	R ²
	CARBONE	0,423	< 0,0001	0,179
	AZOTE_TOT	0,343	0,000	0,117
	CR_EXT	0,319	0,001	0,102
	NA_ECH	0,296	0,002	0,088
	MG_ECH	0,242	0,011	0,059
	CsurN	0,240	0,012	0,058
	FE_ECH	0,219	0,022	0,048
	CU_TOT	-0,190	0,048	0,036
	CU_EXT	-0,240	0,012	0,058
	P_ASS	-0,434	< 0,0001	0,188

3. Données microbiologiques et variables explicatives

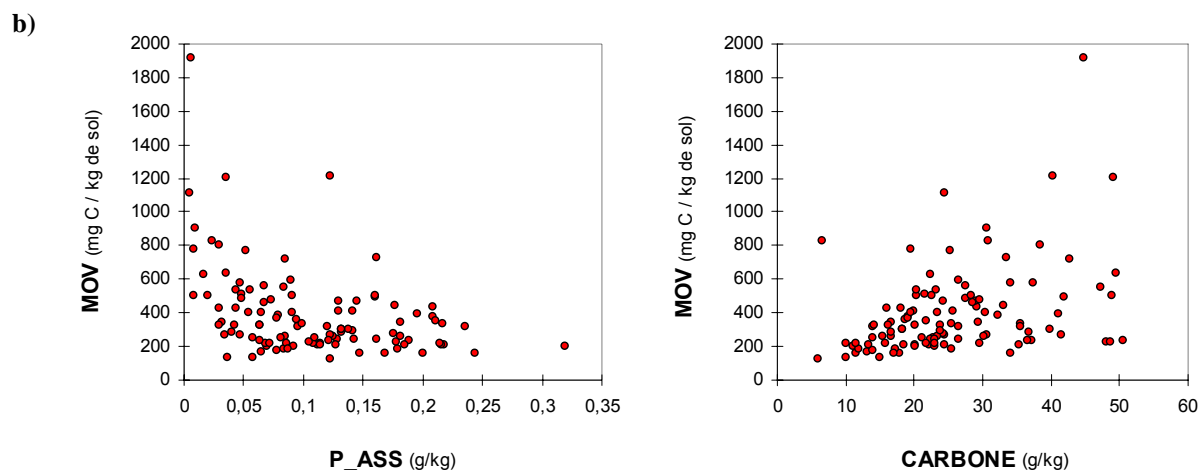


Figure 19 : Corrélations significatives entre biomasse microbienne rapportée au carbone total et paramètres physico-chimiques

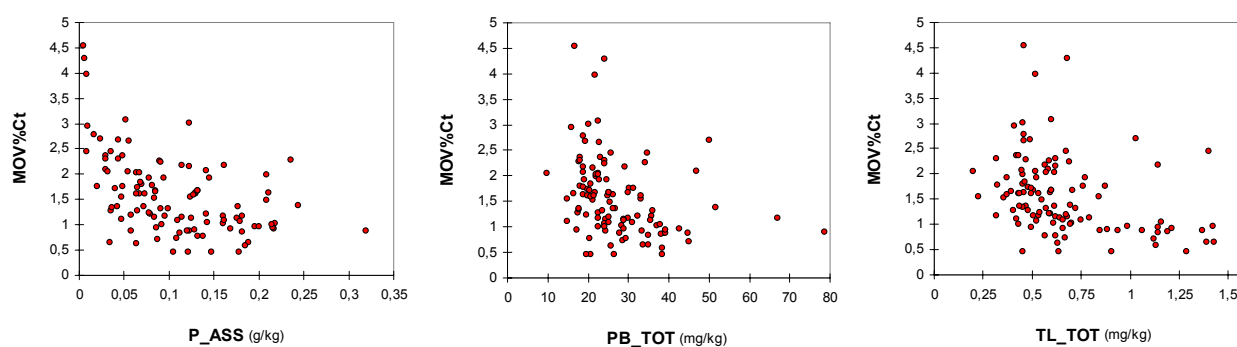
a) tableau des corrélations significatives et b) illustrations des corrélations les plus significatives ($p < 0,0001$) MOV%Ct (N = 108)

a)

MOV%Ct

Variables	R	p
MN_ECH	0,346	0,000
CO_TOT	0,193	0,045
ZN_EXT	-0,191	0,047
CD_EXT	-0,192	0,047
CD_TOT	-0,224	0,020
CA_ECH	-0,272	0,005
AL_TOT	-0,295	0,002
CARBONE	-0,302	0,002
K_TOT	-0,331	0,001
AZOTE_TOT	-0,360	0,000
PB_TOT	-0,433	< 0,0001
TL_TOT	-0,435	< 0,0001
P_ASS	-0,521	< 0,0001

b)



Le nombre de copies d'ADNr 16 S par ng d'ADN extrait du sol est négativement corrélé avec le phosphore assimilable. Les gènes *narG* et *pcaH* ne présentent pas de corrélations significatives avec des paramètres physico-chimiques. Le ratio *narG*/ADNr 16S présente des corrélations négatives avec l'aluminium et le fer échangeable et des corrélations positives avec le cuivre extractible, le phosphore assimilable, le nickel extractible et le pH. Enfin, le ratio *pcaH*/ADNr 16S est quant à lui corrélé avec le phosphore assimilable et le thallium total (Figure 20)

Figure 20 : Corrélations significatives entre paramètres « qPCR » et paramètres physico-chimiques
ADNr 16S (N = 107) ; *narG*/16S (N = 105) ; *pcaH*/16S (N = 106)

ADNr 16S

Variables	R	p
P_ASS	-0,252	0,009

***narG*/16S**

Variables	R	p
CU_EXT	0,266	0,006
P_ASS	0,222	0,023
NI_EXT	0,201	0,039
PH_EAU	0,196	0,046
FE_ECH	-0,231	0,018
AL_ECH	-0,270	0,005

***pcaH*/16S**

Variables	R	p
TL_TOT	0,232	0,017
P_ASS	0,199	0,041

3.1.2 Paramètres microbiologiques et occupation des sols

3.1.2.1 Occupation du sol : premier niveau

Les sites RMQS *BioDiv* ont été classés dans un premier temps selon la nature du système (culture, prairie, forêt) auquel ils appartiennent.

Des tests de Kruskal-Wallis sont effectués pour chaque paramètre en fonction des 3 systèmes. Une procédure de comparaisons multiples est ensuite appliquée pour identifier les groupes présentant des différences (methode de Dunn et correction du niveau de signification de Bonferroni). Les boîtes à moustaches illustrent les résultats. Notons que ces tests sont réalisés sur 107 sites car la dune (site n° 713) et la friche (site n° 551) ne sont pas intégrés dans ces analyses.

Les tests de Kruskal-Wallis sont significatifs pour les paramètres MOV et MOV%*Ct*. Ils sont également significatifs pour ADNr 16S, *narG* et *pcaH* (Figure 21). Par contre, les ratios *narG*/16S et *pcaH*/16S ne présentent pas de relations significatives avec le mode d'occupation des sols (Tableau 4).

Tableau 4 : Résultats des tests de Kruskal-Wallis par système d'occupation des sols (1^{er} niveau)

Paramètres biologiques	Valeur de H	p.value	significativité	C (N=52)	P (N=47)	F (N=8)
Paramètres globaux						
MOV	53,9	< 0,0001	s	a	b	b
MOV% <i>Ct</i>	35,7	< 0,0001	s	a	b	c
ADNr 16 S	11,3	0,003	s	a	b	a,b
Paramètres fonctionnels						
<i>narG</i>	13,4	0,001	s	a	b	a,b
<i>narG</i> /16S	2,7	0,265	ns			
<i>pcaH</i>	8,3	0,016	s	a	b	a,b
<i>pcaH</i> /16S	4,2	0,121	ns			

3. Données microbiologiques et variables explicatives

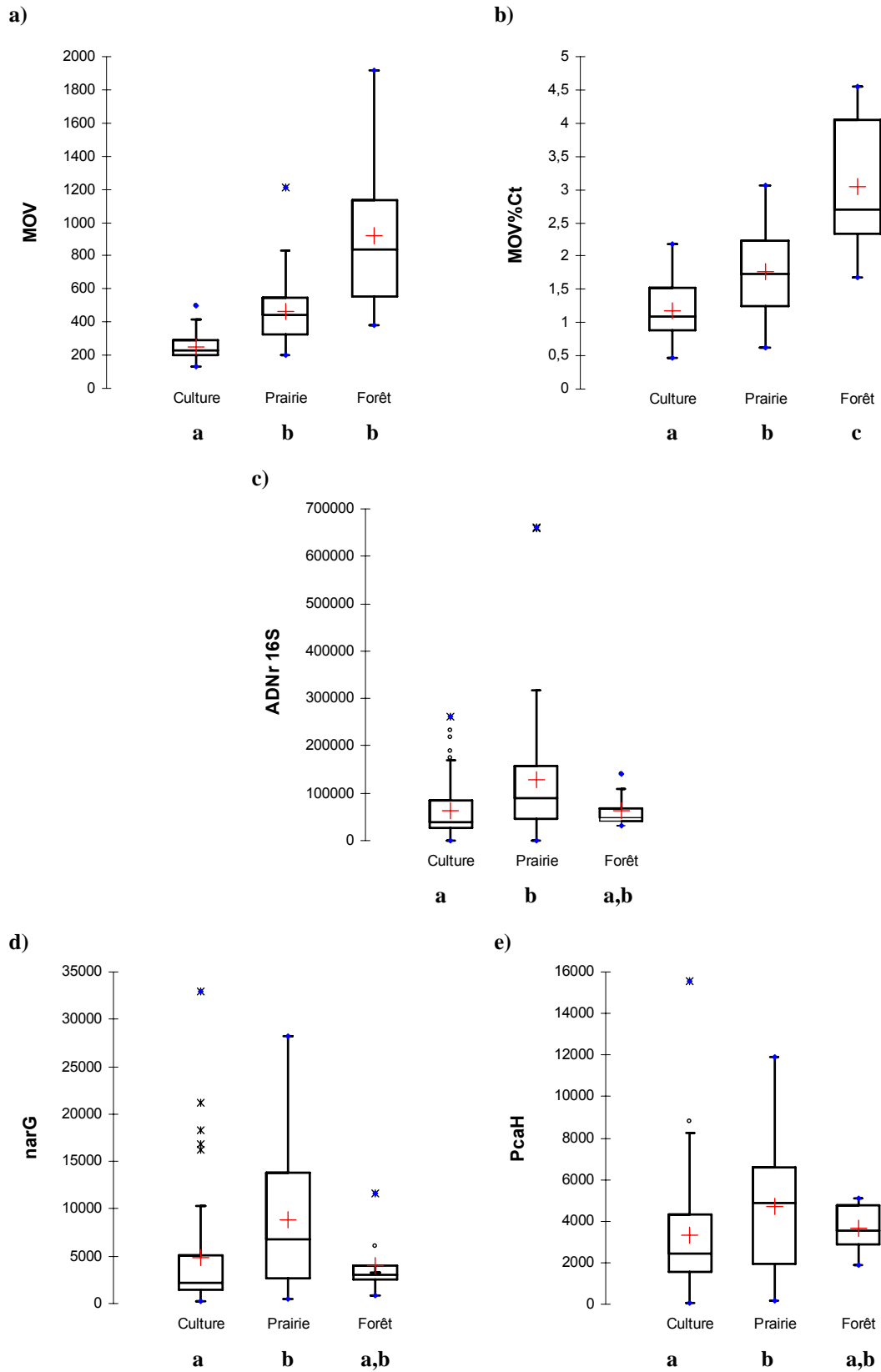


Figure 21 : Paramètres microbiologiques par occupation du sol (niveau 1)
Culture (N = 52) ; Prairie (N = 47) ; Forêt (N = 8)

3.1.2.2 Occupation du sol : deuxième niveau

Dans un second temps, la classification de l'occupation du sol à été affinée en se basant, dans la mesure du possible, sur la codification FAO⁵. Pour les systèmes cultivés, une distinction est établie entre les systèmes toujours en grandes cultures (AA) et les systèmes en grandes cultures incluant des prairies dans la rotation (AA/M). Pour les systèmes prairiaux, les prairies temporaires (M/AA) sont dissociées des prairies permanentes (Mp).

Les mêmes traitements statistiques que précédemment sont appliqués (test de Kruskal-Wallis et correction de Bonferroni).

Le test de Kruskal-Wallis est hautement significatif pour les paramètres de biomasse microbienne. La MOV discrimine les grandes cultures vis-à-vis des prairies permanentes et forêts alors que les rotations grandes cultures-prairies (AA/M et M/AA) sont intermédiaires. Il l'est également pour les paramètres ADNr 16S, narG et pcaH (Figure 22). En revanche les ratios narG/16S et pcaH/16S ne présentent pas de différences en fonction de l'occupation du sol (Tableau 5).

Tableau 5 : Résultats des tests de Kruskal-Wallis par système d'occupation des sols (2^{ème} niveau)

Paramètres lombriciens	Valeur de H	p.value	significativité	AA	AA/M	M/AA	Mp	F
Paramètres globaux				(N=42)	(N=11)	(N=23)	(N=23)	(N=8)
MOV	59,1	< 0,0001	s	a	a,b	b,c	c	c
MOV%Ct	39,7	< 0,0001	s	a,b	a	b,c	c	c
ADNr 16 S	14,4	0,006	s	a	a,b	a,b	b	a,b
Paramètres fonctionnels				(N=42)	(N=10)	(N=22)	(N=23)	(N=8)
narG	16,2	0,002	s	a	a,b	b	b	a,b
narG/16S	3,8	0,429	ns					
pcaH	11,7	0,019	s	a	a,b	a,b	b	a,b
pcaH/16S	5,3	0,261	ns					

⁵ <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0541e/a0541e00.pdf>

3. Données microbiologiques et variables explicatives

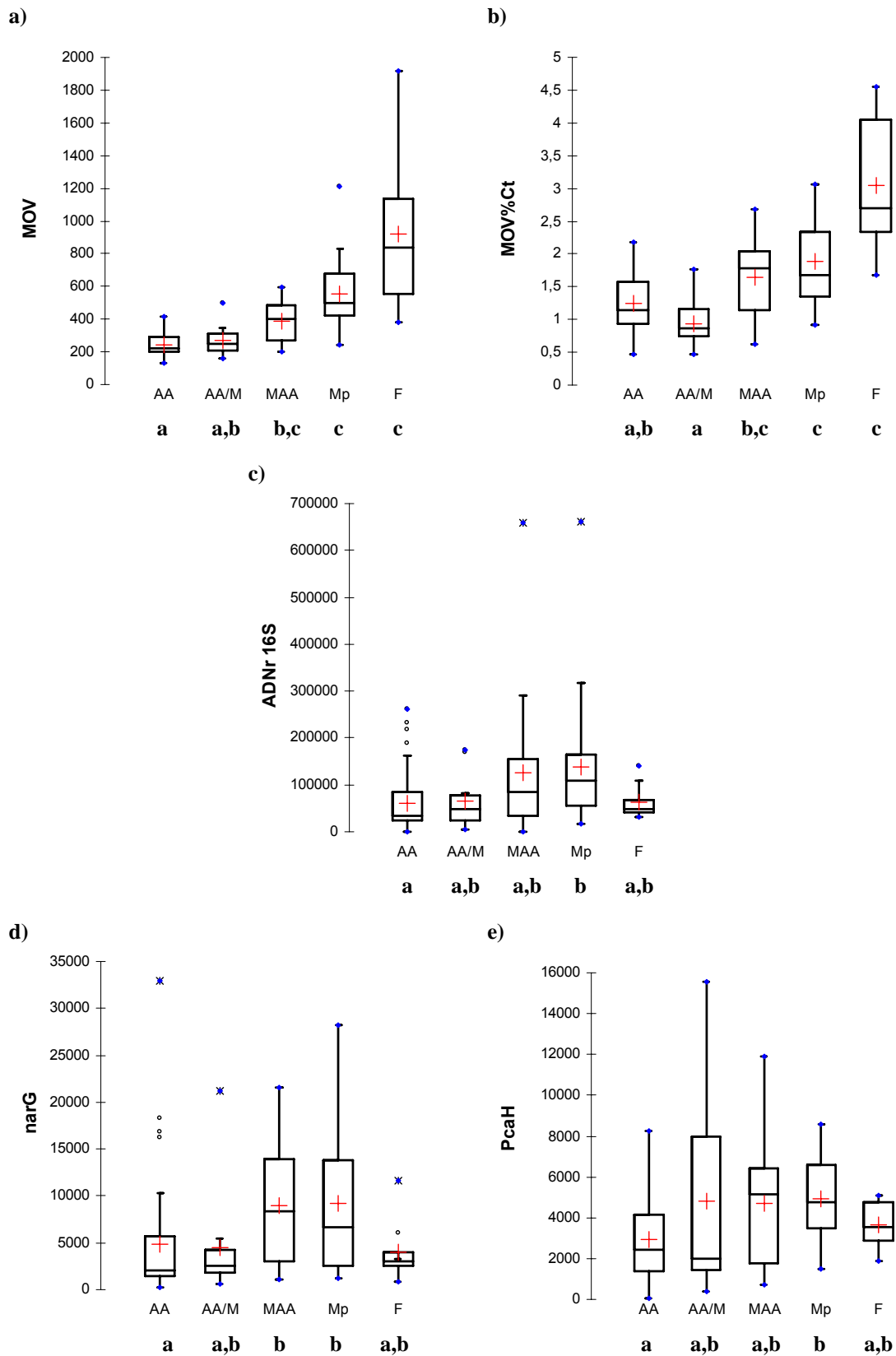


Figure 22 : Paramètres microbiologiques par occupation du sol (niveau 2)

AA : Grande culture (N = 42) ; AA/M : Culture dans rotation grande culture-prairie (N = 11) ;
M/AA : Prairie dans rotation grande culture-prairie (N = 23) ; Mp : Prairie permanente (N = 23) ; F : Forêt (N=8)

3.1.3 Paramètres microbiologiques et pratiques agricoles

Les pratiques agricoles étudiées, ici, sont :

- le type de fertilisation (pas de fertilisation, fertilisation minérale, organique, minérale et organique)
- la présence d'amendement et fertilisation organique (pas de paillage, lisier, fumier, mixte)
- le travail du sol (pas de travail, travail sans labour, travail inf à 25, travail sup à 25)
- les traitements phytosanitaires (oui, non)

Les mêmes traitements statistiques sont appliqués que précédemment (test de Kruskal-Wallis et correction de Bonferroni) pour la majorité des variables. Un test de Mann-Whitney est réalisé pour la variable présence ou absence de traitements phytosanitaires.

Les paramètres de biomasse microbienne (MOV et MOV%*Ct*) discriminent les quatre variables de pratiques agricoles (Figure 23, 24, 25 et 26). Les paramètres ADNr 16S et *narG* présentent des résultats significatifs avec la variable « amendement et fertilisation pailleuse dans la fertilisation » (Figure 24). Les autres paramètres microbiologiques ne sont pas significativement liés avec les variables de pratiques agricoles (Tableau 6).

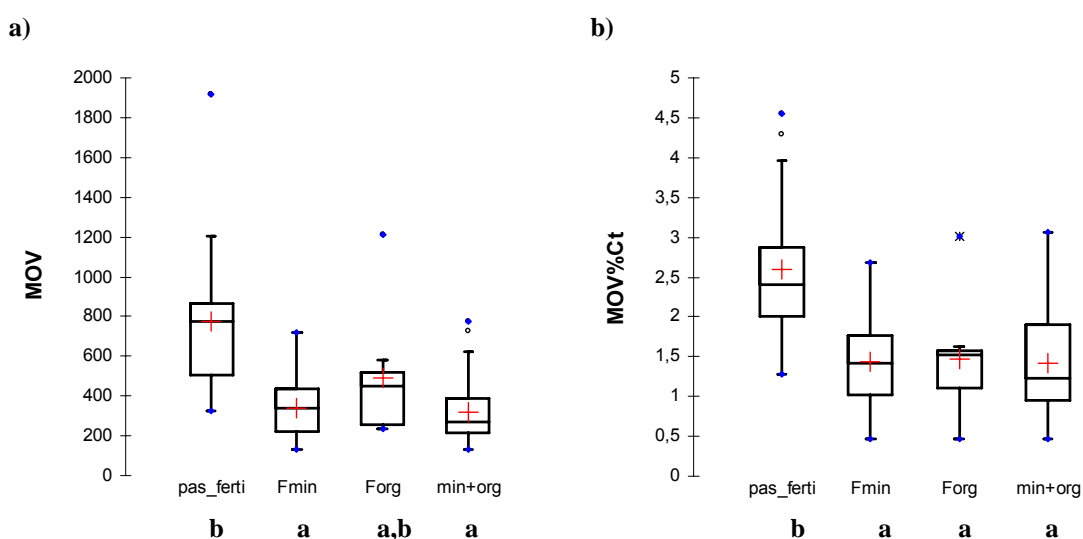


Figure 23 : Biomasse microbienne par type de fertilisation

a) Biomasse microbienne (MOV : mg C / kg de sol)

b) Biomasse microbienne par rapport au carbone total

F min : Fertilisation minérale (N = 20) ; **F org** : Fertilisation organique (N = 8) ;

min + org : Fertilisation minérale et organique (N = 68) ;

pas de ferti : Pas de fertilisation (N = 15 pour MOV et 14 pour MOV%*Ct*)

3. Données microbiologiques et variables explicatives

Tableau 6 : Résultats des tests de Kruskal-Wallis et Mann-Whitney avec les variables de pratiques agricoles

	KW ou MW	p-value	Significativité
<i>MOV</i>			
MOV et Ferti	27,7824	4,035e-06	s
MOV et Pailleux	9,5953	0,02234	s
MOV et Travail_sol	38,2028	2,560e-08	s
MOV et Phyto	1823,5	5,007e-07	s
<i>MOV%Ct</i>			
MOV.Ct et Ferti	21,5637	8,039e-05	s
MOV.Ct et Pailleux	13,5008	0,00367	s
MOV.Ct et Travail_sol	30,6378	1,013e-06	s
MOV.Ct et Phyto	1861	1,226e-07	s
<i>ADNr 16S</i>			
ADNr 16S et Ferti	1,662	0,6454	ns
ADNr 16S et Pailleux	8,5258	0,03631	s
ADNr 16S et Travail_sol	3,493	0,3217	ns
ADNr 16S et Phyto	1149	0,4879	ns
<i>narG</i>			
narG et Ferti	1,2359	0,7444	ns
narG et Pailleux	9,8427	0,01995	s
narG et Travail_sol	6,6826	0,08273	ns
narG et Phyto	1209	0,2587	ns
<i>narG_16S</i>			
narG_16S et Ferti	5,5012	0,1386	ns
narG_16S et Pailleux	4,3975	0,2216	ns
narG_16S et Travail_sol	6,6561	0,0837	ns
narG_16S et Phyto	1060	0,9623	ns
<i>PcaH</i>			
PcaH et Ferti	0,8705	0,8325	ns
PcaH et Pailleux	7,6996	0,05265	ns
PcaH et Travail_sol	3,0867	0,3784	ns
PcaH et Phyto	1040	0,9277	ns
<i>PcaH_16S</i>			
PcaH_16S et Ferti	2,948	0,3997	ns
PcaH_16S et Pailleux	7,2595	0,06407	ns
PcaH_16S et Travail_sol	1,8197	0,6107	ns
PcaH_16S et Phyto	928,5	0,3677	ns

MOV (N = 109) ; MOV%Ct (N = 108) ; ADNr 16S, narG, narG/16S, PcaH, PcaH/16 (N = 107)

Des pratiques de fertilisation différentes induisent donc des différences sur les paramètres MOV et MOV%Ct. Pour les autres paramètres microbiens, seule l'amendement et fertilisation pailleuse augmente significativement l'ADNr 16S et *narG*.

3. Données microbiologiques et variables explicatives

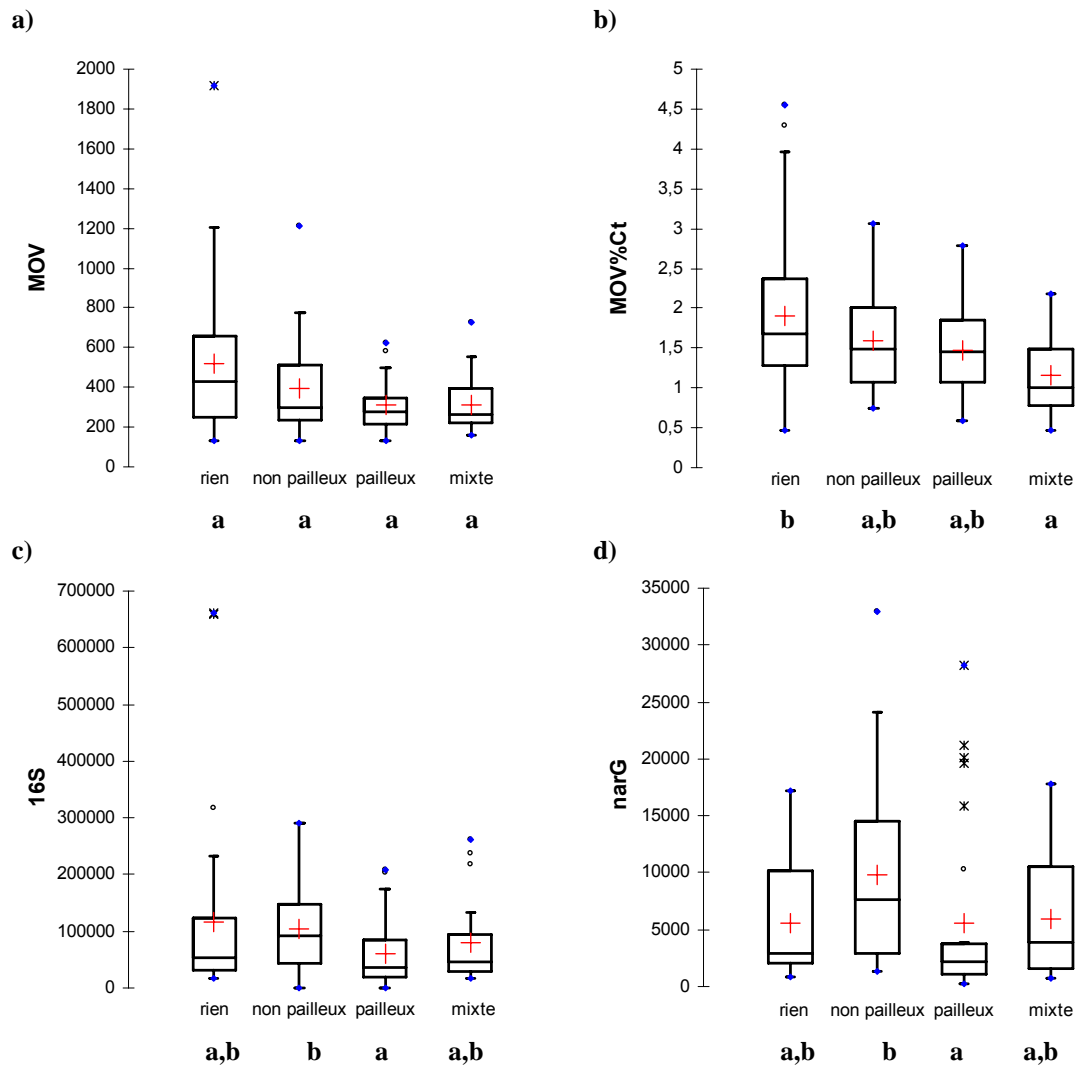


Figure 24 : Paramètres microbiologiques par type d'amendement et de fertilisation organique

- a)** Biomasse microbienne (MOV : mg C / kg de sol)
- b)** Biomasse microbienne par rapport au carbone total
- c)** Biomasse bactérienne (nb de copies d'ADNr 16 S / ng d'ADN)
- d)** narG (nb de copies / ng d'ADN)

Rien : Pas de fertilisation et fertilisation minérale (N = 35) ; **Non pailleux** : lisier, fientes et purin (N = 24) ; **Pailleux** : fumier (N = 28) ; **Mixte** : fumier + lisier (N = 21)

3. Données microbiologiques et variables explicatives

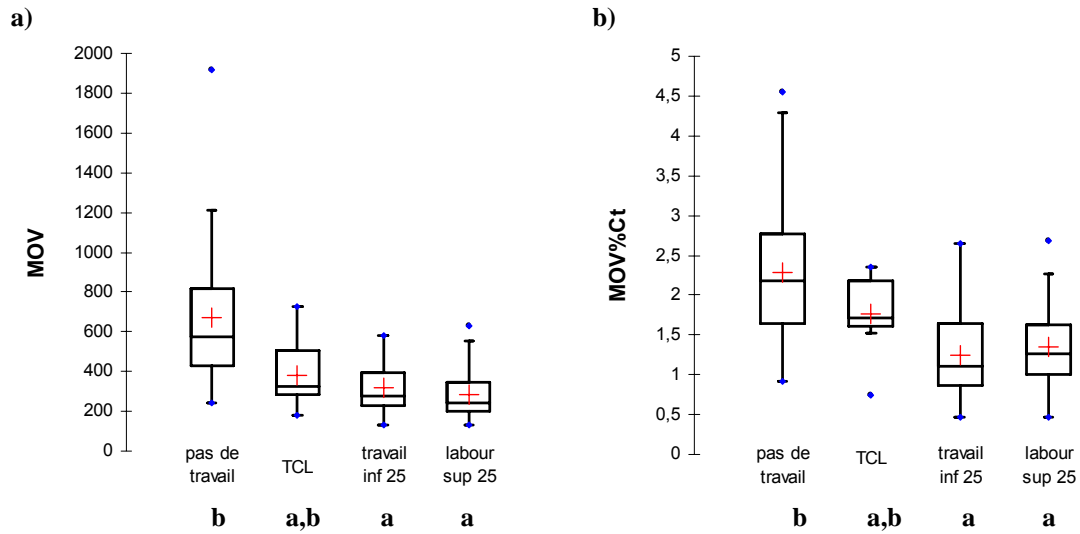


Figure 25 : Biomasse microbienne par type de travail du sol

a) Biomasse microbienne (MOV : mg C / kg de sol)

b) Biomasse microbienne par rapport au carbone total

Pas de travail : Pas de travail du sol (N = 27) ; **TCL** : Technique sans labour (N = 9) ;
Travail inf 25 : travail inférieur à 25 cm (N = 36) ; **Labour sup 25** : labour sup ou égal à 25 (N = 37).

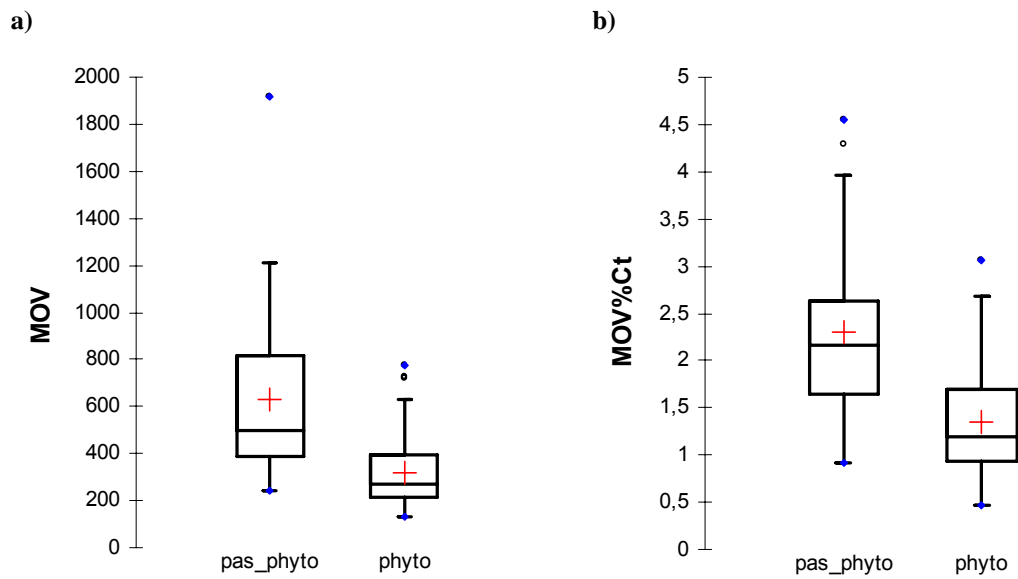


Figure 26 : Biomasse microbienne par gestion phytosanitaire

a) Biomasse microbienne (MOV : mg C / kg de sol)

b) Biomasse microbienne par rapport au carbone total

Pas de phyto : Pas de traitements phytosanitaires (N = 26) ; **Phyto** : Traitements phytosanitaires (N = 82)

3.1.4 Paramètres microbiologiques et caractéristiques pédologiques

Les données pédologiques utilisées ici sont basées sur le code tarière. Ce code synthétique rassemble des informations sur :

- la géologie
- l'hydromorphie
- le profil de sol
- la profondeur de sol

Les mêmes traitements statistiques que précédemment sont appliqués (test de Kruskal-Wallis et correction de Bonferroni).

Quelques paramètres microbiologiques présentent des résultats significatifs avec les variables pédologiques :

- ratio *pcaH*/ADNr 16S et géologie (Figure 27)
- biomasse microbienne rapporté au carbone total et hydromorphie (Figure 28)
- *narG* et hydromorphie
- ratio *narG*/ADNr 16S et hydromorphie
- ratios *narG*/ADNr 16S et profil de sol (Figure 29)

Notons qu'aucun résultat significatif n'est retrouvé avec la variable profondeur de sol (Tableau 7).

3. Données microbiologiques et variables explicatives

Tableau 7 : Résultats des tests de Kruskal-Wallis avec les variables pédologiques

	KW	p-value	Significativité
<i>Géologie</i>			
MOV	6,99	0,64	ns
MOV% <i>Ct</i>	13,21	0,15	ns
ADNr 16S	9,88	0,36	ns
narG	9,05	0,43	ns
pcaH	7,11	0,63	ns
narG/ADNr 16S	12,79	0,17	ns
pcaH/ADNr 16S	20,97	0,01	s

	KW	p-value	Significativité
<i>Hydromorphie</i>			
MOV	7,86	0,05	ns
MOV%<i>Ct</i>	16,6	0,00	s
ADNr 16S	1,88	0,60	ns
narG	8,78	0,03	s
pcaH	3,37	0,34	ns
narG/ADNr 16S	8,42	0,04	s
pcaH/ADNr 16S	0,94	0,81	ns

	KW	p-value	Significativité
<i>Profil de sol</i>			
MOV	0,76	0,68	ns
MOV% <i>Ct</i>	3,80	0,15	ns
ADNr 16S	1,29	0,53	ns
narG	3,55	0,17	ns
pcaH	0,01	1,00	ns
narG/ADNr 16S	9,11	0,01	s
pcaH/ADNr 16S	0,61	0,74	ns

	KW	p-value	Significativité
<i>Profondeur</i>			
MOV	0,54	0,91	ns
MOV% <i>Ct</i>	7,68	0,05	ns
ADNr 16S	1,70	0,64	ns
narG	1,86	0,60	ns
pcaH	0,29	0,96	ns
narG/ADNr 16S	2,31	0,51	ns
pcaH/ADNr 16S	3,15	0,37	ns

3. Données microbiologiques et variables explicatives

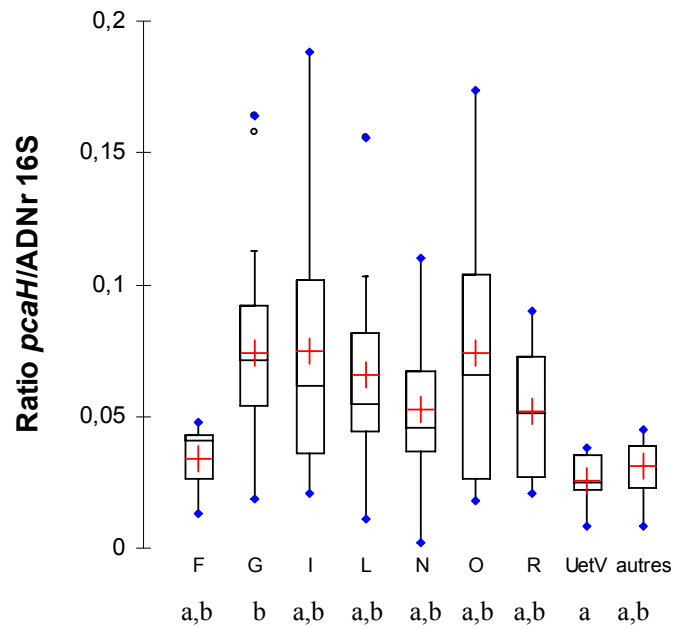


Figure 27 : Ratio *pcaH*/ADNr 16S par matériau parental

F : Micashiste (N = 5) ; **G** : Granite (N = 26) ; **I** : Gneiss (N = 10) ; **L** : Limon (N = 13) ;
N : Schiste tendre (N = 21) ; **O** : Schiste moyen (N = 11) ; **R** : Schiste gréseux (N = 8) ;
UetV : Matériau d'apport colluvial et alluvial (N = 5) ;
autres : Sable, Terrasse caillouteuse, Grès dur, Eboulis de pente (N = 5)

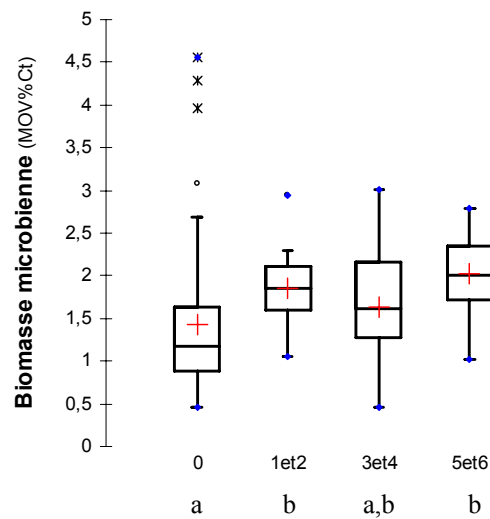


Figure 28 : Biomasse microbienne (MOV% Ct) par classe d'hydromorphie

0 : Absence d'hydromorphie (N = 61) ;
1 et 2 : taches d'oxydo-réduction à une prof sup à 80 cm (N = 12) ;
3 et 4 : taches d'oxydo reduction à une prof entre 40 et 80 cm (N = 25) ;
5 et 6 : taches d'oxydo reduction dès la surface (N = 10)

3. Données microbiologiques et variables explicatives

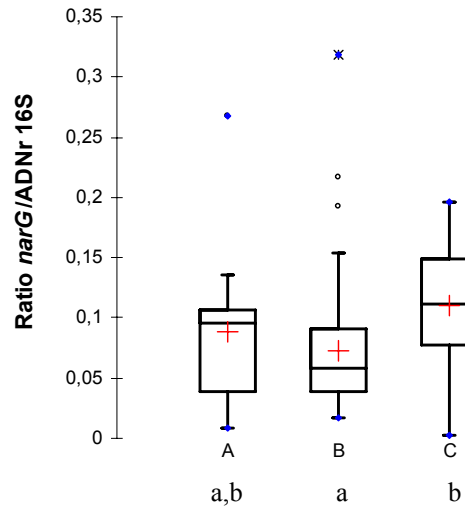


Figure 29 : Ratios *narG*/ADNr 16S par type de sol
B : Sol brun (N = 72) ; C : Sol brun faiblement lessivé (N = 20) ; A : Autres sols (N = 13)

3.1.5 Paramètres microbiologiques et année de prélèvement

L'étude de la variabilité interannuelle a été appréhendée par un test de Mann-Whitney réalisé uniquement sur les systèmes prairiaux (N= 45) dont 22 sites ont été réalisés en 2006 et 23 sites en 2007.

Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre les prairies échantillonnées en 2006 et celle en 2007 pour les paramètres de biomasse microbienne (Figure 30.a) et le ratio et *pcaH*/ADNr 16S. En revanche, pour l'ADNr 16S (Figure 30.b), *narG* (Figure 30.c), *pcaH* et le ratio *narG*/ADNr 16S, des différences significatives existent entre les valeurs des deux années en milieu prairial (Tableau 8).

Tableau 8 : Résultats des tests de Mann-Whitney par année pour les sites prairiaux

	U	p-value	Significatif
MOV	212,000	0,358	Non
MOV%Ct	269,000	0,725	Non
16S	412,000	0,000	Oui
<i>narG</i>	493,000	< 0,0001	Oui
<i>PcaH</i>	408,000	0,000	Oui
<i>narG</i> _16S	348,500	0,031	Oui
<i>PcaH</i> _16S	214,000	0,382	Non

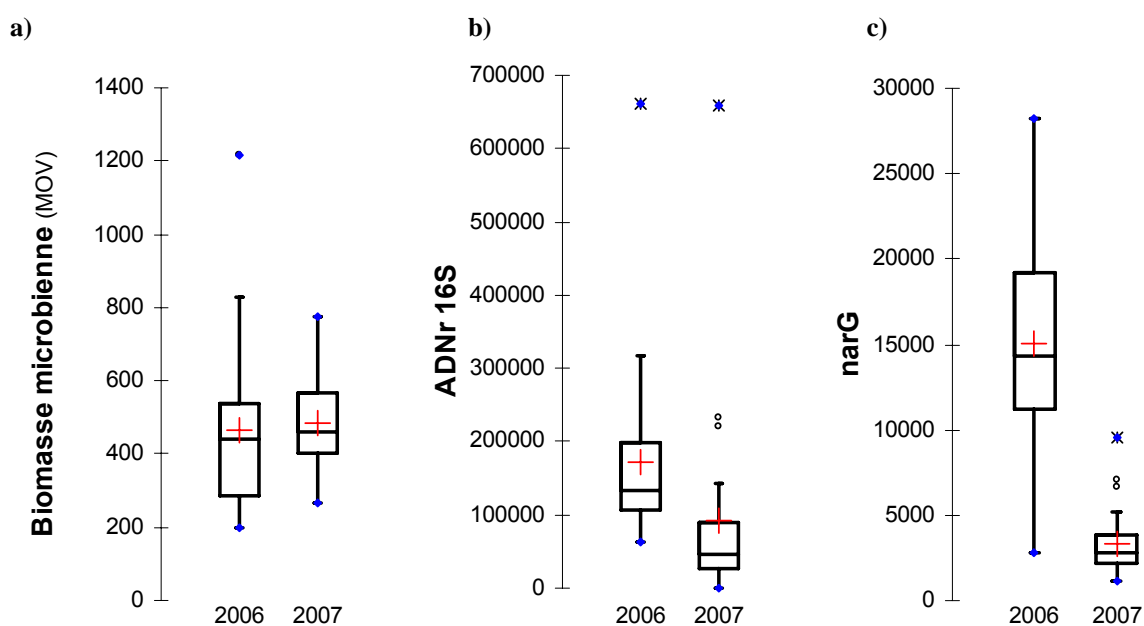


Figure 30 : Paramètres microbiologiques par année en système prairial

a) Biomasse microbienne (MOV) ; b) ADNr 16S ; c) *narG* ; N = 45

3.1.6 Paramètres microbiologiques et humidité des sols

L'humidité du sol des échantillons RMQS *BioDiv* a été mesurée par l'équipe de Montpellier. Pour identifier un lien entre l'humidité du sol et les paramètres microbiologiques des tests de corrélation (Spearman) ont été effectués.

Une corrélation significative ($R = 5,17$; $p < 0,0001$; $r^2 = 0,267$) existe entre les valeurs de biomasse microbienne (MOV) et le pourcentage d'humidité des échantillons. Ce dernier est lié à la teneur en argile et secondairement à la matière organique, ces deux paramètres influençant positivement le niveau de biomasse microbienne (Figure 31).

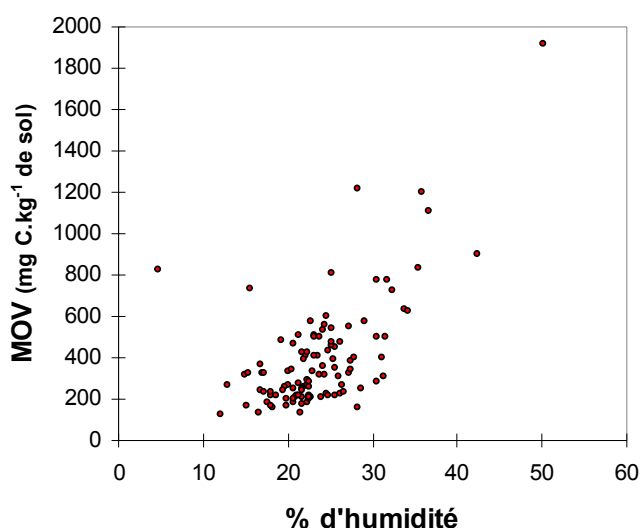


Figure 31 : Biomasse microbienne en fonction de l'humidité des échantillons sur les sites RMQS *BioDiv*

A l'inverse, lorsqu'il s'agit de la MOV exprimé en pourcentage de carbone total il n'y a pas de corrélation significative. De la même manière, les paramètres issus de la qPCR (ADNr 16S, narG, pcaH) et les ratios (narG/16S et pcaH/16S) qui en découlent ne présentent pas de corrélations significatives avec le pourcentage d'humidité des échantillons.

3. Données microbiologiques et variables explicatives

3.2 Structure génétique des communautés bactérienne en lien avec les variables explicatives

3.2.1 Données B-ARISA et paramètres physico-chimiques

La mise en évidence de liens entre les paramètres physico-chimiques et les données B-ARISA des sites RMQS *BioDiv* est appréhendée par l'analyse de co-inertie. Cette analyse permet de mettre en évidence l'existence de co-structure entre deux jeux de données. Dans ce cas, aucune co-structure avec les paramètres physico-chimiques n'a pu être mise en évidence.

3.2.2 Données B-ARISA et année de prélèvement

Les années de prélèvement des sites RMQS BioDiv ont été représentées sur le plan factoriel de l'ACP des données B-ARISA (cf : 1.3). Sur l'axe 1, une opposition très distincte entre les deux années 2006 et 2007 est observée (Figure 32). Ceci sous entend que la structure génétique des communautés bactérienne présentent une variabilité inter annuelle. Cette variabilité inter-annuelle peut être d'origine climatique ou méthodologique.

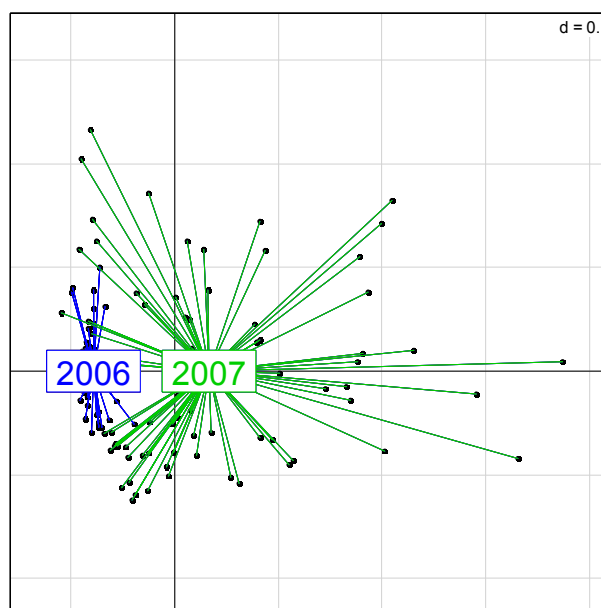


Figure 32 : Plan factoriel (1-2) des sites de l'ACP sur les bandes B-ARISA par année de prélèvement

3.2.3 Données B-ARISA et « système d'occupation des sols »

Les trois systèmes (Culture, Prairie, Forêt) sont illustrés sur le plan factoriel de l'ACP des données B-ARISA (Figure 33). Lorsque les trois systèmes sont représentés seuls, les ellipses se recouvrent largement. En revanche, lorsque l'information est dissociée entre les deux années, un gradient entre les sites cultivés, prairiaux puis forestiers se distingue sur l'axe 2 représentant 13,64 % de la variance.

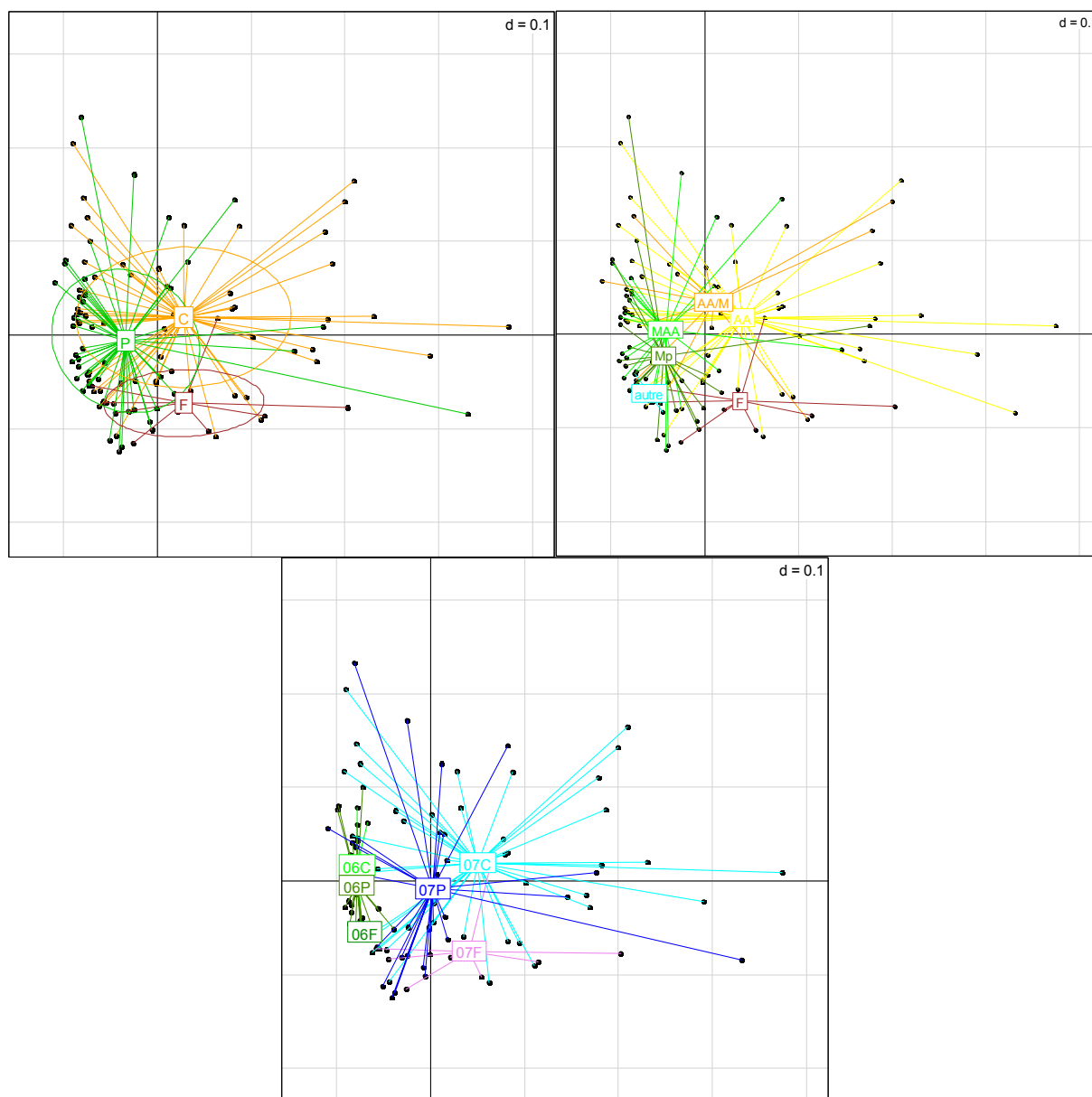


Figure 33 : Plan factoriel (1-2) des sites en fonction de l'occupation des sols

3.2.4 Données B-ARISA et pratiques agricoles

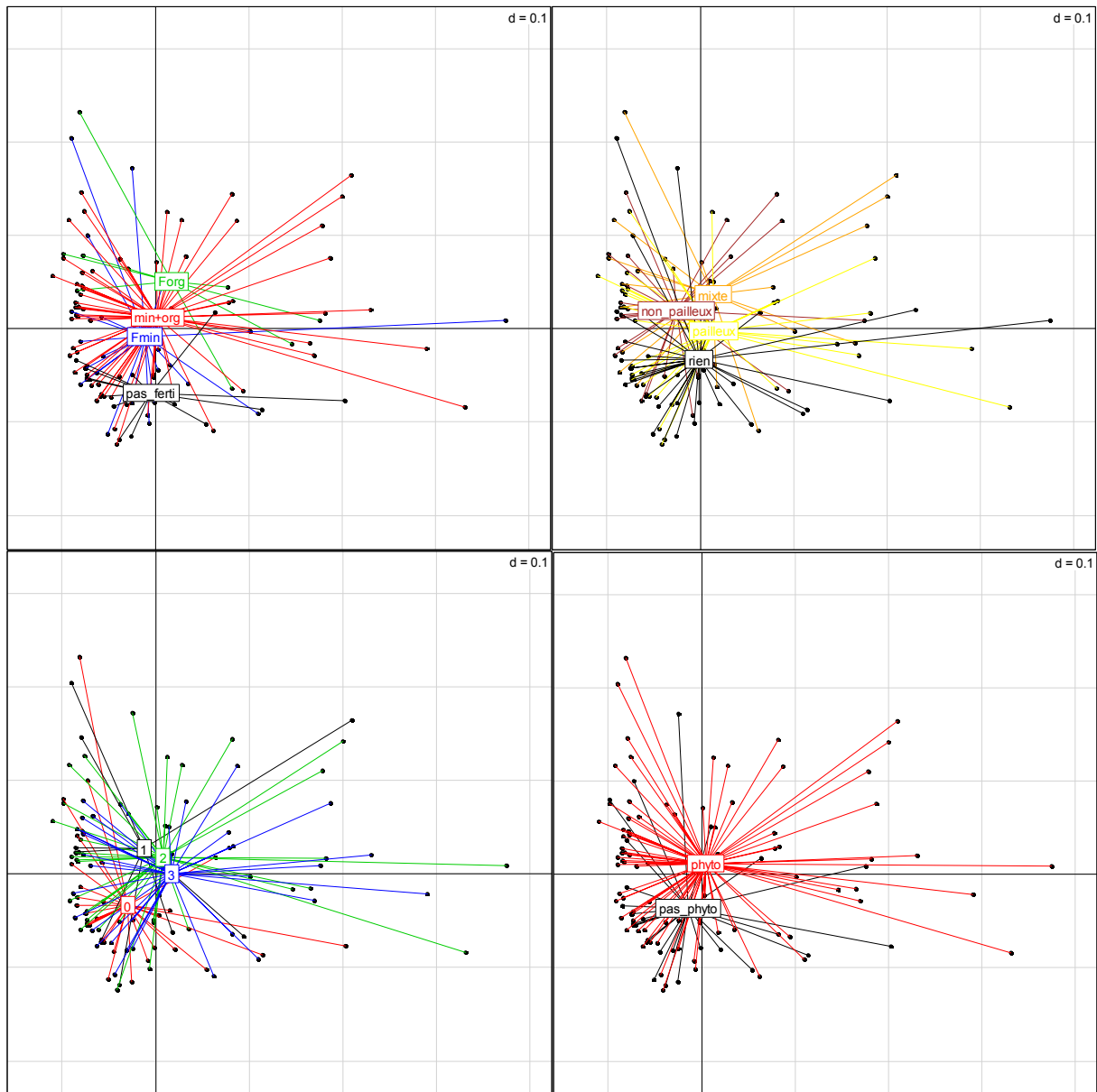


Figure 34 : Plan factoriel (1-2) des sites en fonction des pratiques agricoles

SYNTHESE

Biomasse microbienne (MOV et MOV%Ct) :

- Les valeurs de biomasse microbienne ne montrent pas de structuration spatiale à l'échelle régionale. Ceci montre que d'autres facteurs, liés au sol et à son utilisation, ont une importance majeure.
- La comparaison des résultats obtenus sur les échantillons prélevés au printemps 2006 et au printemps 2007 ne met pas en évidence de *variabilité interannuelle*. Ceci indique que le niveau de biomasse microbienne est moins sensible à une éventuelle variabilité climatique interannuelle qu'à des facteurs plus « permanents » comme le type de sol et son utilisation (système de culture, pratiques culturales).
- L'expression de la biomasse microbienne en valeurs relatives (MOV%Ct) discrimine très bien les trois *systèmes d'occupation des sols*
- Des corrélations intéressantes sont mises en évidence entre la biomasse microbienne et certains *paramètres physico-chimiques*. Par exemple, la corrélation négative avec le Phosphore assimilable est à mettre en relation avec un gradient d'intensification agricole entre les sols naturels, les prairies, les cultures. La corrélation positive avec l'humidité des sols est probablement une fonction indirecte de propriétés des sols (texture, teneur en matière organique, etc.).

Abondance relative de la communauté bactérienne (qPCR ADNr 16S) :

- L'abondance relative du gène ADNr 16S montre, comme les autres approches basées sur l'extraction directe de l'ADN, une nette variabilité interannuelle. Bien que l'on ne puisse exclure totalement un effet de la climatologie, il est très probable que cette variabilité soit en réalité d'origine méthodologique : l'ADN des échantillons traités en 2007 a été purifié avec un lot de PVPP différent de celui de 2006 et il a été observé par ailleurs que ce changement pouvait affecter les résultats.

- En termes de *systèmes d'occupation des sols*, ce paramètre discrimine les prairies des cultures. On n'observe pas, en revanche, de corrélations avec des paramètres physico-chimiques du sol. Le *Phosphore assimilable* est le seul paramètre pour lequel une tendance se dessine.

Abondance relative des communautés bactériennes fonctionnelles (*narG* et *pcaH*) :

- Les gènes marqueurs d'activité fonctionnelle (*narG* et *pcaH*) ne montrent pas de structuration spatiale à l'échelle régionale.
- Comme pour les gènes ADNr 16S, on observe une nette *variabilité interannuelle*. Comme évoqué précédemment, cette variabilité est plus probablement d'origine méthodologique et en lien avec la purification de l'ADN extrait du sol.
- L'abondance relative (en nombre de copies par ng d'ADN) des gènes *narG* et *pcaH* permet de discriminer les *systèmes d'occupation des sols* (prairies, cultures), alors que ce n'est pas le cas des ratios *narG*/ADNr16S et *pcaH*/ADNr16S.
- En ce qui concerne les *paramètres physico-chimiques*, la seule corrélation significative est celle observée entre le ratio *narG*/ADNr16S et l'aluminium échangeable. La relation négative entre ces deux paramètres est logique dans la mesure où il y a généralement peu de nitrates les sols très acides (dans lesquels on peut trouver de l'aluminium échangeable).

Structure génétique de la communauté bactérienne globale (B-ARISA) :

- Comme les paramètres précédents, basés sur une extraction directe de l'ADN du sol, on observe pour les B-ARISA une très forte *variabilité interannuelle* dont on a vu qu'elle est très probablement d'origine méthodologique (lots de PVPP).
- Pour une année donnée, les B-ARISA discriminent assez bien les *systèmes d'occupation des sols* (prairies, cultures, forêts).

- En revanche, les matrices de co-inertie ne mettent pas en évidence de relations claires avec les *paramètres physico-chimiques* des sols. Il est possible que ces derniers aient moins de poids que les cultures (plantes) sur la structure des populations bactériennes (effet rhizosphère et nature biochimique des rhizodépôts).

Table des illustrations

Figure 1 : Groupes biologiques étudiés et équipes partenaires associées du programme RMQS BioDiv.....	2
Figure 2 : Statistiques descriptives (a), boîtes à moustaches (b) et histogramme (c) des données de MOV	10
Figure 3 : Statistiques descriptives (a), boîtes à moustaches (b) et histogramme (c) des données de MOV%Ct .	11
Figure 4 : Statistiques descriptives (a), boîtes à moustaches (b) et histogramme (c) des données qPCR ADNr 16S	13
Figure 5 : Statistiques descriptives (a), boîtes à moustaches (b) et histogramme (c) de l'abondance des séquences narG dans l'ADN du sol	15
Figure 6 : Statistiques descriptives (a), boîtes à moustaches (b) et histogramme (c) du ratio narG/16S	16
Figure 7 : Statistiques descriptives (a), boîtes à moustaches (b) et histogramme (c) des données qPCR pcaH ..	17
Figure 8 : Statistiques descriptives (a), boîtes à moustaches (b) et histogramme (c) du ratio pcaH/16S	18
Figure 9 : Plan factoriel (1-2) de l'ACP sur la matrice de covariance des données B-ARISA	20
Figure 10 : Nuages de points des corrélations les plus significatives entre paramètres microbiologiques	22
Figure 11 : Corrélogramme (a) et variogramme (b) de la biomasse microbienne (MOV%Ct)	24
Figure 12 : Carte de la biomasse microbienne	25
Figure 13 : Carte de la biomasse microbienne (exprimée en pourcentage du carbone total).....	25
Figure 14 : Carte du nombre de copies de l'ADNr 16 S par ng d'ADN du sol.....	26
Figure 15 : Corrélogramme (a) et variogramme (b) de pcaH.....	27
Figure 16 : Carte du nombre de copies de narG par ng d'ADN du sol (a) et du ratio narG/ADNr 16S (b).....	28
Figure 17 : Carte du nombre de copies de pcaH par ng d'ADN de sol (a) et du ratio pcaH/ADNr 16S (b).....	29
Figure 18 : Corrélations significatives entre biomasse microbienne et paramètres physico-chimiques.....	31
Figure 19 : Corrélations significatives entre biomasse microbienne rapportée au carbone total et paramètres physico-chimiques	32
Figure 20 : Corrélations significatives entre paramètres « qPCR » et paramètres physico-chimiques	33
Figure 21 : Paramètres microbiologiques par occupation du sol (niveau 1)	35
Figure 22 : Paramètres microbiologiques par occupation du sol (niveau 2)	37
Figure 23 : Biomasse microbienne par type de fertilisation	38
Figure 24 : Paramètres microbiologiques par type d'amendement et de fertilisation organique.....	40
Figure 25 : Biomasse microbienne par type de travail du sol	41
Figure 26 : Biomasse microbienne par gestion phytosanitaire	41
Figure 27 : Ratio pcaH/ADNr 16S par matériau parental.....	44
Figure 28 : Biomasse microbienne (MOV%Ct) par classe d'hydromorphie	44
Figure 29 : Ratios narG/ADNr 16S par type de sol.....	45
Figure 30 : Paramètres microbiologiques par année en système prairial	46
Figure 31 : Biomasse microbienne en fonction de l'humidité des échantillons sur les sites RMQS BioDiv	47
Figure 32 : Plan factoriel (1-2) des sites de l'ACP sur les bandes B-ARISA par année de prélèvement.....	49
Figure 33 : Plan factoriel (1-2) des sites en fonction de l'occupation des sols.....	50
Figure 34 : Plan factoriel (1-2) des sites en fonction des pratiques agricoles	51
Tableau 1 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres microbiologiques (N=109)	22
Tableau 2 : R, p value et R ² des corrélations les plus significatives	22
Tableau 3 : Synthèse des résultats géostatistiques pour les paramètres microbiologiques.	23
Tableau 4 : Résultats des tests de Kruskal-Wallis par système d'occupation des sols (1er niveau)	34
Tableau 5 : Résultats des tests de Kruskal-Wallis par système d'occupation des sols (2ème niveau)	36
Tableau 6 : Résultats des tests de Kruskal-Wallis et Mann-Whitney avec les variables de pratiques agricoles ...	39
Tableau 7 : Résultats des tests de Kruskal-Wallis avec les variables pédologiques	43
Tableau 8 : Résultats des tests de Mann-Whitney par année pour les sites prairiaux.....	46

Bibliographie

- ADEME**, 2004 - Développement de bioindicateurs permettant de caractériser l'état du sol et son fonctionnement biologique. Appel à projets "Bioindicateurs".
- Chaussod R.**, 1996 - La qualité biologique des sols : évaluation et implications. *Etude et Gestion des Sols*, numéro spécial, 3,4.
- Chaussod R.**, Houot S., Guiraud G. and Hétier J.M., 1988 - Size and turnover of the microbial biomass in agricultural soils: laboratory and field measurements. *In* : Nitrogen efficiency in agricultural soils and the efficient use of fertilizer nitrogen, Jenkinson & Smith, Eds., Elsevier Applied Science (London), pp 312-326.
- Dacey M.**, 1968 - A review of measures of contiguity for two and k-color maps. *Spatial Analysis: a Reader in Statistical Geography* (eds B. J. L. Berry & D. F. Marble), pp. 479±490. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Dolédec S.**, Chessel D., 1994 - Co-inertia analysis: an alternative method for studying species-environment relationships. *Freshwater Biology*. 31: 277-294.
- El Azhari N.**, Chabaud S., Percept A., Bru D. and Martin-Laurent D. 2007 - *pcaH*, a molecular marker for estimating the diversity of the protocatechuate-degrading bacterial community in the soil environment. *Pest Management Science*, 63, pp 459-467.
- Henry S.**, Baudoin E., Lopez-Gutiérrez J.-C., Martin-Laurent F., Brauman A., Philippot L., 2004 - Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. *J. Microbiology Methods*, 59:327-335.
- ISO 14.240-2 :1997** - Qualité du sol Détermination de la biomasse microbienne du sol. Partie 2 : Méthode par fumigation-extraction.
- ISO CD/11063**. Qualité des sols – Méthode pour extraire directement l'ADN d'échantillons de sol
- Jolivet C.**, Boulonne L., Ratié C., 2006 - Manuel du Réseau de Mesures de la qualité des Sols. Edition 2006, Unité Infosol, INRA Orléans, France, 190p.
- Lopez-Gutiérrez J.-C.**, Henry S., Hallet S., Martin-Laurent F., Catroux G., Philippot L., 2004 - Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR. *J. Microbiology Methods*, 57:399-407.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2354-2359.

- Moran** P.A.P., 1948 - The interpretation of statistical maps. *Journal of the Royal Statistical Society*. 10:243-251.
- Moran** P.A.P., 1950 - Notes on continuous stochastic phenomena. *Biometrika*. 37: 17-23.
- Ranjard** L., Poly F., Combrisson J., Richaume A., Gourbière 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 fingerprinting approach (RISA). *Microb Ecol.*, 39:263–272.
- Ranjard** L.; Lejon D.P.H.; Mougel 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.
- Walter** C., Cluzeau D., Hallaire V., Lanadé M., Pérès G., Lemerancier B., Vertès F., Chaussod R., Hénault C. et Curmi P. 2004. Caractérisation, déterminisme et surveillance de la qualité des sols en milieu acide (Bretagne). Rapport contrat GESSOL.

Table des annexes

Annexe I. Conditions de normalité

Annexe II. Résultats des analyses géostatistiques

Annexe I : Conditions de normalité

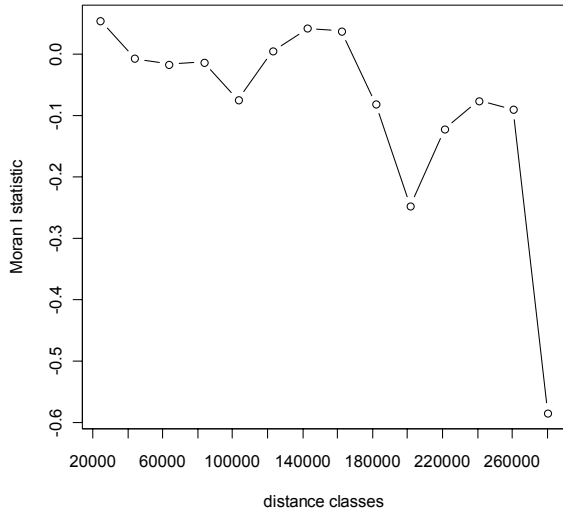
Tableau : Condition de normalité des paramètres microbiologiques

Paramètres microbiologiques	Transformation des données	Nombre de sites restants	Sites écartés
MOV	box-cox ($\lambda = 0,01$)	104	719, 603, 664, 427, 671
MOV%<i>Ct</i>	box-cox ($\lambda = 0,01$)	108	713
ADNr 16 S			
<i>narG</i>			
<i>narG/16S</i>	box-cox ($\lambda = 0,267$)	107	665 et 656
<i>pcaH</i>	box-cox ($\lambda = 0,42$)	109	
<i>pcaH/16S</i>	box-cox ($\lambda = 0,357$)	106	656, 421 et 665

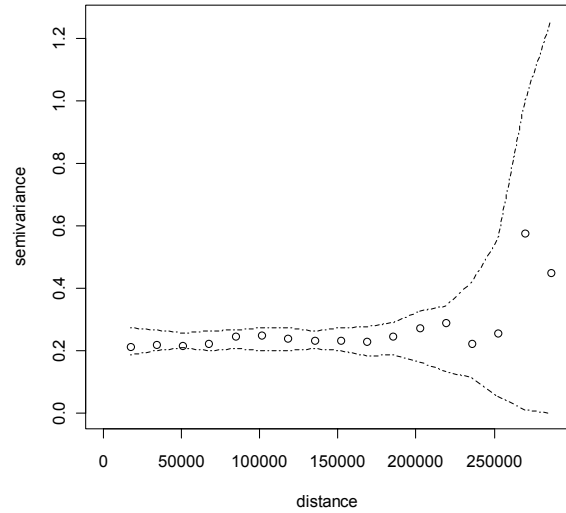
Annexe II : Résultats des analyses géostatistiques

II.1 : Corrélogramme (a) et variogramme (b) de la biomasse microbienne (MOV)

a)

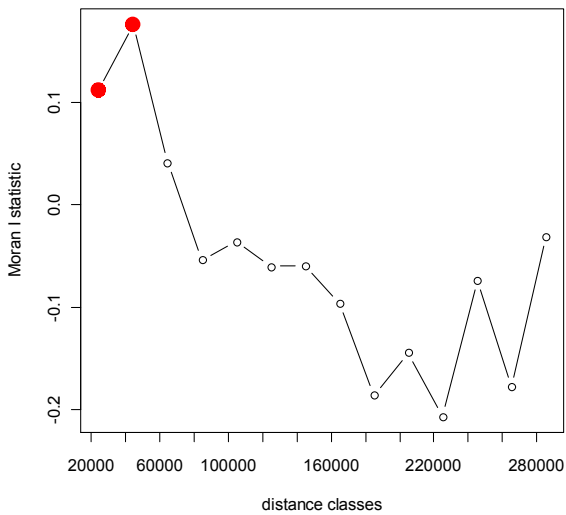


b)

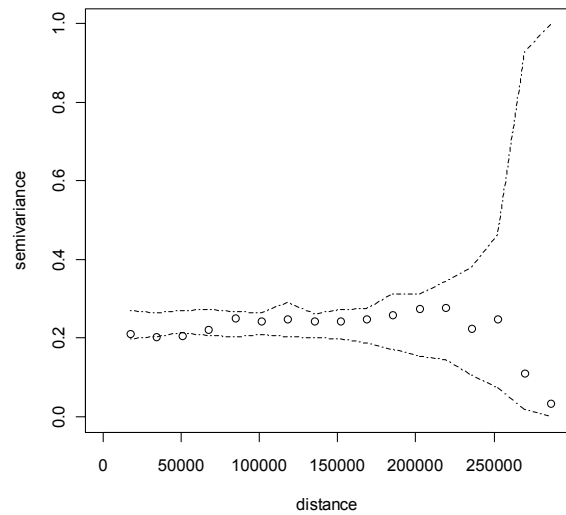


II.2 : Corrélogramme (a) et variogramme (b) de la biomasse microbienne rapporté au carbone total (MOV%Ct)

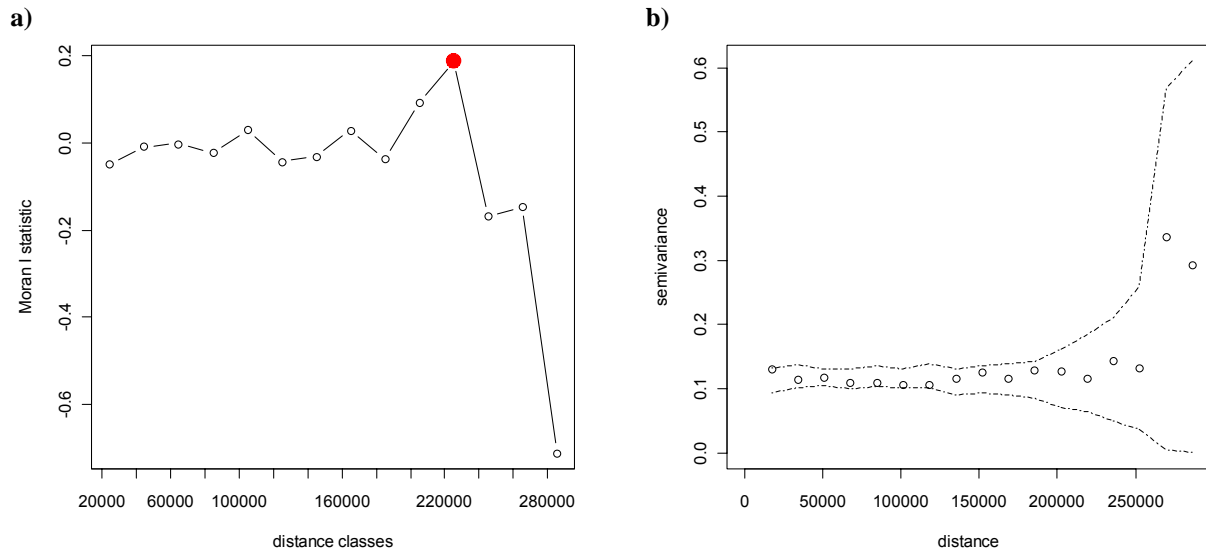
a)



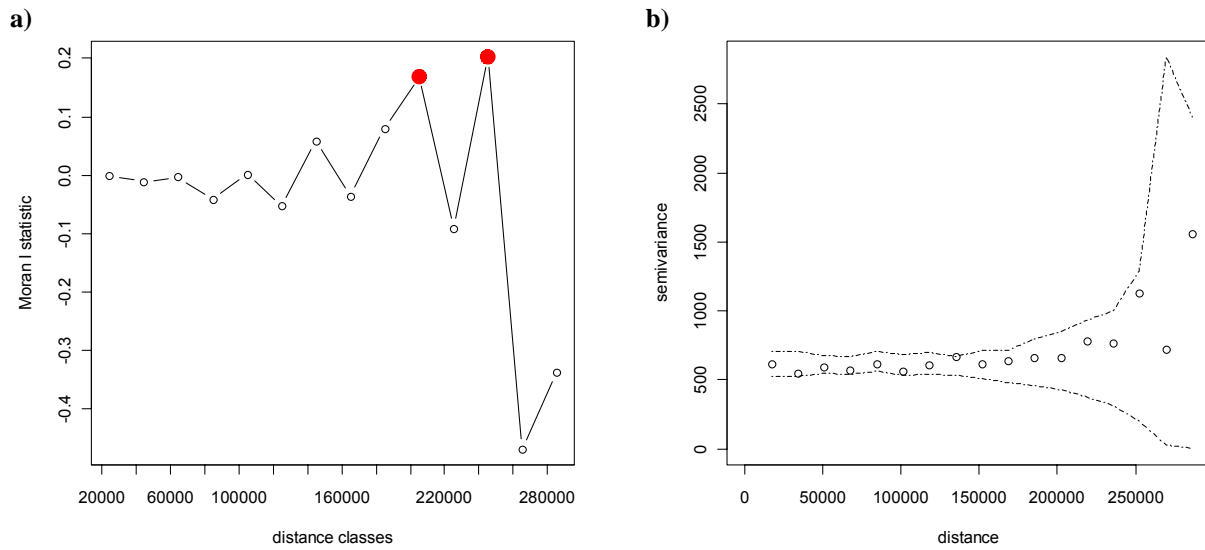
b)



II.3 : Corrélogramme (a) et variogramme (b) du ratio narG/16S

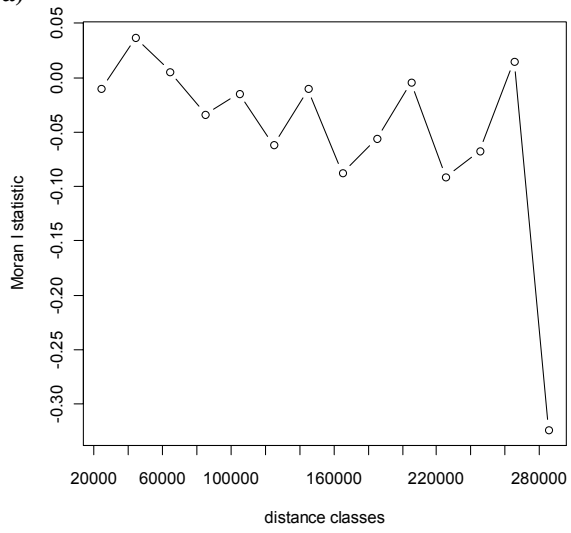


II.4 : Corrélogramme (a) et variogramme (b) de pcaH



II.5 : Corrélogramme (a) et variogramme (b) du ratio pcaH/16S

a)



b)

