

Impact d'amendements organiques sur la structure des communautés microbiennes des sols :

Choix des méthodes, validation et résultats

C. Leyval⁽¹⁾, C. Steinberg⁽²⁾, M.P. Norini⁽³⁾, T. Beguiristain⁽¹⁾, V. Edel-Hermann⁽²⁾, P. Leglize⁽¹⁾, N. Gautheron⁽²⁾, T. Lebeau⁽³⁾ et S. Houot⁽⁴⁾

- 1) Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique dans les Sols, UMR 7137 Nancy Université CNRS, Faculté des Sciences BP70239 54506 Vandoeuvre-les-Nancy cedex, France
- 2) UMR INRA-Université de Bourgogne, Microbiologie du Sol et de l'Environnement et Géochimie des Sols, 17 rue Sully - BP 86510, 21065 Dijon cedex, France
- 3) Plate-forme Technologique « Agrosystèmes », IUT Colmar, Université de Haute-Alsace, BP 50568, 68008 COLMAR cedex, France
- 4) INRA, UMR Environnement et Grandes Cultures, 78850 Thiverval Grignon, France

RÉSUMÉ

L'analyse des communautés microbiennes, bactériennes et fongiques présentes dans un sol peut permettre d'évaluer la capacité des écosystèmes à répondre à des changements de conditions environnementales. L'étude présentée ici a pour objectif d'estimer l'impact de produits résiduels organiques (PRO) de natures différentes sur la structure des communautés microbiennes dans les sols (bactériennes et fongiques, incluant les champignons mycorhiziens) en utilisant deux techniques d'analyse de l'ADN extrait des sols : la PCR-TTGE et la PCR-T-RFLP. Des échantillons de sol et de racines ont été prélevés sur le dispositif expérimental de Feucherolles (78) entre septembre 2004 et octobre 2006, et plus précisément sur des parcelles Témoin sans azote (-N), Témoin fertilisé (T+N), avec apport de compost d'ordures ménagères résiduelles avec fertilisation (OMG+N), et apport de compost de déchets verts et boue et fertilisation (DVB+N). Les analyses de la structure des différentes communautés étant effectuées par différentes techniques et par trois laboratoires différents, une validation inter-laboratoires a été nécessaire. Le principe de chacune de ces techniques, leur application aux échantillons prélevés sur le site de Feucherolles et une synthèse des résultats obtenus sont présentés. La structure des communautés bactériennes et fongiques dépend de la méthode d'extraction d'ADN utilisée et du laboratoire qui fait l'analyse. Cependant, les extraits d'ADN obtenus avec les différentes méthodes d'extraction permettent d'aboutir à la même conclusion quant à la discrimination des traitements. Les résultats montrent que les communautés bactériennes et fongiques du sol du site de Feucherolles semblent assez stables et peu influencées par les traitements (OMR+N, DVB+N, T+N), ou que l'effet des traitements est masqué par d'autres effets comme un effet temporel ou une variabilité spatiale.

Mots clés

Bactérie, champignon, mycorhize à arbuscules, ADN, sol, structure moléculaire des communautés microbiennes, TTGE, T-RFLP, compost, boue, amendement organique.

SUMMARY

IMPACT OF ORGANIC AMENDMENTS ON MICROBIAL COMMUNITY STRUCTURE IN SOIL:

Choice of methods, validation, and results

The analysis of microbial (bacterial and fungal) community structure in soil can be used to evaluate the ecosystem ability to cope with changes in environmental parameters. The objective of the present study was to assess the impact of different residual organic matter (PRO) amendments on a field site (Feucherolles, 78) on microbial (bacterial and fungal, including mycorrhizal) community structure in soil, using two DNA analysis techniques: PCR-TTGE and T-RFLP. Soil and root samples were collected on the field experimental site at Feucherolles (78) between September 2004 and October 2006, on fertilized control plots (T+N), non fertilized control (T-N), plots with urban waste compost and fertilization (OMG+N) and plots with green compost and sludge and fertilization (DVB+N). Since microbial community structures were analysed using different techniques and were performed by three different laboratories, an inter-laboratory validation was performed. The principle of both techniques, results of the interlaboratory validation, and a selection of the results obtained with the soil samples from Feucherolles are presented. Bacterial and fungal community structure differed with the DNA extraction and analytical method and with laboratories. However, the conclusions about the effect of the treatments were comparable. Results showed that bacterial and fungal communities on Feucherolles site were rather stable and not influenced by the treatments (OMG+N, DVB+N, T+N), or that their effects were overwhelmed by temporal and spatial variations.

Key-words

Bacteria, fungi, arbuscular mycorrhizas, DNA, soil, molecular structure of microbial communities, TTGE, T-RFLP, compost, sludge, organic amendment.

RESUMEN

IMPACTO DE ENMIENDAS ORGÁNICAS SOBRE LA ESTRUCTURA DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DE LOS SUELOS:

Elección de métodos, validación y resultados

El análisis de las comunidades microbianas y fúngicas presentes en un suelo puede permitir evaluar la capacidad de los ecosistemas a contestar a cambios de condiciones ambientales. El estudio presentado aquí tenía como objetivo estimar el impacto de productos residuales orgánicos (PRO) de naturaleza diferente sobre la estructura de las comunidades microbianas en los suelos (bacterianas y fúngicas, incluyendo hongos micorrizianos) usando dos técnicas de análisis del ADN extraído de los suelos: la PCR-TTGE y la PCR-T-RFLP. Se tomaron muestras de suelo y de raíces en el dispositivo experimental de Feucherolles (78) entre Septiembre 2004 y Octubre 2006, y más precisamente sobre las parcelas testigo sin nitrógeno (-N), testigo fertilizado (F+N), con aporte de compost de basuras domésticas residuales con fertilización (OMG+N), y aporte de compost de desechos verdes y lodos y fertilización (DVB+N). Como los análisis de la estructura de las diferentes comunidades se efectuaron por diferentes técnicas y por tres laboratorios diferentes, una validación inter-laboratorios fue necesaria. Se presenta el principio de cada técnica, su aplicación a las muestras tomadas en el sitio de Feucherolle y una síntesis de los resultados obtenidos. La estructura de las comunidades bacterianas y fúngicas depende del método de extracción del ADN usado y del laboratorio que hace el análisis. Sin embargo, los extractos de ADN obtenidos con los diferentes métodos de extracción permiten llegar a la misma conclusión en cuanto a discriminación de los tratamientos. Los resultados muestran que las comunidades bacterianas y fúngicas del suelo del sitio de Feucherolles parecen bastante estables y poco influenciadas por los tratamientos (OMG+, DVB+N, T+N), o que el efecto de los tratamientos está encubierto por otros efectos como un efecto temporal o una variabilidad espacial.

Palabras clave

Bacterias, hongos, micorrizas arbusculares, ADN, suelo, estructura molecular de las comunidades microbianas, TTGE, T-RFLP, compost, lodo, enmiendas orgánicas.

Les sols sont des réservoirs de microorganismes, dont les interactions avec les constituants minéraux et organiques conditionnent le fonctionnement des cycles biogéochimiques. Actuellement, les sols sont de plus en plus influencés par des activités anthropiques d'origines diverses, agricoles, urbaines, industrielles, et deviennent des récepteurs de polluants variés. La présence de ces composés potentiellement toxiques dans les sols à des concentrations parfois très élevées peut avoir des conséquences non négligeables sur les organismes et, par voie de conséquence, sur le fonctionnement biologique des sols. Cet effet des polluants sur les organismes mérite d'être précisé et étudié, et la réponse de la microflore pourrait être utilisée comme indicateur de la qualité biologique des sols (Janvier *et al.*, 2007).

Dans le sol, les bactéries et les champignons participent au déroulement des cycles biogéochimiques et aux processus de décomposition, à la transformation et au transport de la matière organique, à la mobilité et au transfert sol-plante des éléments nutritifs, mais aussi des polluants. Ces microorganismes ont un rôle central dans le fonctionnement des écosystèmes et constituent un réservoir génétique important. Les champignons mycorrhiziens, qui vivent en symbiose avec les racines de la majeure partie des espèces végétales, améliorent la croissance des plantes et les protègent en conditions de stress (attaques de pathogènes, stress hydrique, présence de polluants) (Smith et Read, 1997; Leyval *et al.*, 1997; Leyval et Binet, 1998), sont aussi des partenaires importants de la qualité biologique des sols et des systèmes sol-plante.

Les microorganismes dans leur ensemble sont des organismes clés du fonctionnement des écosystèmes et sont les premiers touchés dans le cas d'une contamination des sols ou des eaux. L'évaluation des risques écotoxicologiques liés aux intrants d'origine anthropique sur la qualité des sols repose souvent sur le suivi d'un groupe bactérien particulier utilisé comme indicateur (Brandt *et al.* 2006), de mesures d'activité globales (Saison *et al.*, 2009) ou de profils physiologiques de communautés bactériennes (Viti *et al.*, 2008), plus rarement sur la prise en compte de l'ensemble du microbiota que les auteurs réduisent trop souvent aux seules communautés bactériennes (Boivin *et al.*, 2006; Lazzaro *et al.*, 2006; Zabaloy *et al.*, 2008). Par ailleurs, le risque écotoxicologique est évalué par rapport à l'utilisation de pesticides (Centofanti *et al.*, 2008) ou de pollution d'origine industrielle (Wilke *et al.*, 2008). Le caractère écotoxicologique de produits résiduels organiques est en général étudié en relation avec le devenir d'une matière active particulière (Vieublé-Gonod *et al.*, 2007) mais l'effet global de différents types de produits résiduels organiques sur le microbiota de sols agricoles est beaucoup moins mesuré. A l'inverse, la « plus value » attendue d'amendements organiques divers apportés à des sols agricoles a suscité le développement de méthodes permettant de mesurer leur impact sur l'ensemble du biota et a révélé des effets variables selon la réactivité des

communautés affectées et selon la nature des amendements organiques (Edel-Hermann *et al.*, 2008; Pérez-Piqueres *et al.*, 2006). L'analyse des communautés bactériennes et fongiques présentes dans un sol peut, plus généralement, permettre d'évaluer les modifications des écosystèmes en réponse à des changements de conditions environnementales (Kiikkila *et al.* 2001; Lejon *et al.*, 2008).

Dans le cadre du programme Qualiagro, des produits résiduels organiques (PRO) de natures différentes ont été apportés sur le site de Feucherolles (78) et leur impact sur les qualités agronomiques des sols a été évalué. Sur la base d'un plan expérimental en blocs comprenant des parcelles témoins, des épandages de composts d'ordures ménagères résiduelles (OMR) sur certaines parcelles et de composts de déchets verts plus boues d'épuration (DVB) sur d'autres parcelles ont été réalisés en octobre 2004 (Houot *et al.*, 2009).

Une approche microbiologique est cependant nécessaire pour compléter les données agronomiques. En réponse à l'appel à projets sur les Bioindicateurs de l'ADEME, l'objectif de la présente étude était d'évaluer l'impact de ces amendements sur la structure des communautés bactériennes et fongiques dans les sols et des champignons mycorrhiziens dans les racines en utilisant deux techniques moléculaires d'analyse de l'ADN extrait des sols: la PCR-TTGE (Polymerase Chain Reaction -Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) et la PCR-T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism). Ces techniques sont appliquées à l'analyse de la structure des communautés bactériennes et des communautés fongiques par l'utilisation d'amorces spécifiques des différents groupes microbiens. Ces analyses ont été réalisées sur des prélèvements effectués dans les différentes parcelles (4 blocs) avant l'épandage, 2 mois après l'épandage et régulièrement ensuite pendant 2 ans afin de mesurer à travers la réponse de la microflore la résistance et la résilience du sol à cette perturbation. La technique de TTGE a été utilisée par la Plate-Forme technologique « Agrosystèmes » (IUT de Colmar) pour étudier la structure des communautés bactériennes, et par le LIMOS (Nancy Université CNRS) pour étudier la structure des communautés fongiques et mycorrhiziennes. La technique de T-RFLP a été utilisée par le Laboratoire de Microbiologie du Sol et de l'Environnement et Géochimie des Sols (INRA, Université de Bourgogne) pour étudier la structure des communautés bactériennes et fongiques.

Les analyses ayant été effectuées dans trois laboratoires différents, une étape de validation inter-laboratoires préalable des techniques a été nécessaire. Les résultats de cette intercalibration sont présentés et discutés ainsi qu'une partie des résultats obtenus sur l'ensemble de l'étude.

CHOIX DES MÉTHODES UTILISÉES (PRINCIPES, AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS)

L'approche retenue pour l'analyse de la structure et la diversité des communautés microbiennes du sol est une approche moléculaire qui permet de s'affranchir du caractère cultivable ou non de ces microorganismes (Prosser, 2002). La première étape de cette approche consiste à extraire et à purifier l'ADN présent dans le sol. L'ADN extrait sert ensuite de matrice pour l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) de fragments de gènes codant l'ADN ribosomique (ADNr)(16S bactérien, 18S ou ITS (Internal Transcribed Spacer) fongiques). L'étape d'amplification par PCR permet d'obtenir un mélange de molécules d'ADN de tailles voisines mais de séquences nucléotidiques différentes. Une des manières d'analyser les amplicons d'ADN ribosomique obtenus à partir d'échantillons environnementaux consiste à les cloner et à les séquencer. De nos jours, bien que le séquençage soit devenu plus routinier, l'analyse de milliers de clones reste une tâche assez lourde, laborieuse et coûteuse. C'est pourquoi plusieurs techniques alternatives, comme la TTGE ou la T-RFLP permettant de séparer ces amplicons, ont été développées.

La TTGE

La TTGE consiste à réaliser une séparation électrophorétique de fragments d'ADN basée sur des différences de séquences nucléotidiques. Cette technique a d'abord été utilisée pour

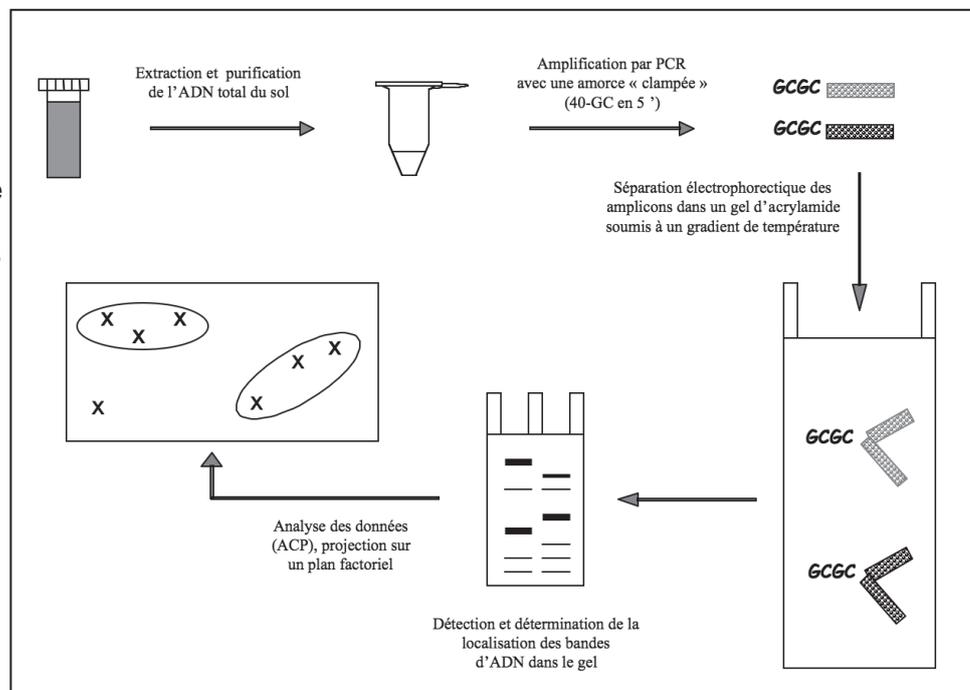
détecter des mutations ponctuelles dans des séquences d'ADN humain avant d'être appliquée, par Muyzer et al. (1993), à l'étude de la diversité microbienne. Dans ce cadre d'étude, les fragments d'ADNr amplifiés par PCR à partir d'ADN extrait du sol sont soumis à une électrophorèse dans un gel d'acrylamide dont la température augmente progressivement au cours de la migration. Le principe de la TTGE consiste à utiliser ce gradient de température pour modifier la mobilité électrophorétique des fragments d'ADN (figure 1). En effet, l'augmentation de la température dénature partiellement l'ADN bicaténaire et ralentit, voire arrête, sa migration dans le gel. La température de dénaturation d'un fragment d'ADN dépend de sa séquence nucléotidique et conditionne par conséquent sa localisation dans le gel à la fin de la migration. Pour éviter une dénaturation complète des fragments d'ADN, la PCR est réalisée avec une amorce clampée, qui consiste à ajouter 35 à 40 bases G et C à son extrémité 5'. Cette technique permet en théorie de séparer des fragments d'ADN différents d'une paire de base (Miller et al., 1999).

L'analyse des profils de bandes (nombre, localisation) obtenus pour chaque échantillon environnemental permet de comparer rapidement la structure des communautés microbiennes de ces échantillons. De plus, les bandes du gel peuvent être excisées, ré-amplifiées par PCR, pour séquencer l'ADN présent dans ces bandes et identifier l'espèce microbienne par comparaison aux banques de données de séquences.

La TTGE, comme la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) où la dénaturation est réalisée non pas par un gradient de température mais par un gradient de dénaturants

Figure 1: Représentation schématique de la procédure d'analyse par TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) de fragments d'ADN amplifiés par PCR à l'aide d'une amorce « clampée » et séparés par électrophorèse dans un gradient de température.

Figure 1: Graphical presentation of the TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) analytical procedure of DNA fragments amplified with clamp primers and separated on temperature gradient electrophoresis.



chimiques, est une technique qui permet de comparer de manière rapide, reproductible, simultanée et peu coûteuse un grand nombre d'échantillons environnementaux (Muyzer, 1999). Cette technique est particulièrement adaptée à l'analyse de populations microbiennes et permet de suivre leur évolution en fonction du temps ou des variations des conditions environnementales (Muyzer et Smalla, 1998). Cependant, comme de nombreuses méthodes moléculaires, la TTGE dépend grandement de l'efficacité et de la qualité de l'étape d'extraction et de purification de l'ADN du sol. Cette technique ne permet de mettre en évidence que les espèces les plus abondantes et elle peut présenter également certaines limitations dues au fait qu'une bande ne représente pas nécessairement une seule espèce (co-migration) (Gelsomino *et al.*, 1999) où qu'un même microorganisme puisse générer plusieurs bandes (plusieurs copies d'ADNr légèrement différentes) (Gelsomino *et al.*, 1999; Maarit-Niemi *et al.*, 2001).

La T-RFLP

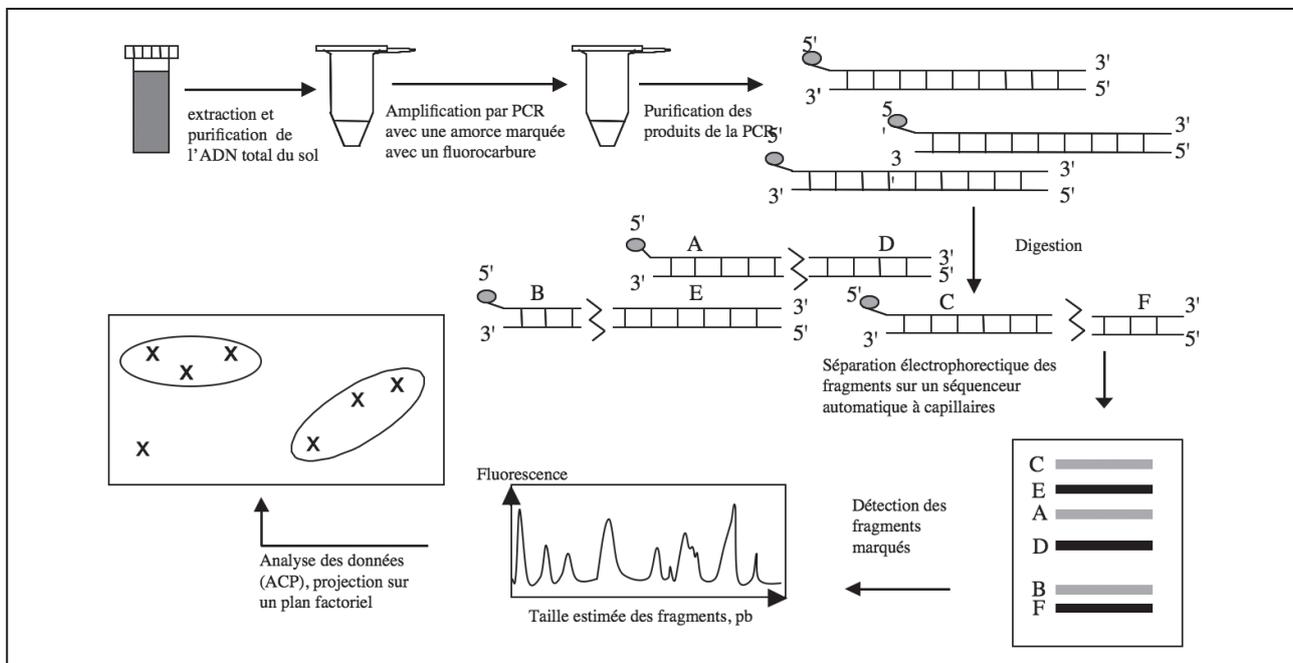
L'analyse d'ADNr par T-RFLP permet de caractériser des communautés bactériennes ou fongiques en révélant le polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux de la région d'ADNr ciblée pour chacune de ces communautés (*figure 2*). La méthode implique une amplification

par PCR de l'ADNr 16S, ou de l'ADNr 18S en utilisant un couple d'amorces spécifiques de chacune de ces communautés. Une des deux amorces de chaque couple est marquée à son extrémité par un composé fluorescent. Les produits d'amplification sont ensuite soumis à une digestion par une enzyme de restriction, générant des fragments de restriction terminaux fluorescents de différentes tailles, en fonction des séquences d'ADNr des microorganismes présents dans la communauté analysée (Liu *et al.*, 1997; Marsh *et al.*, 2000). Les fragments de restriction terminaux fluorescents sont séparés en fonction de leur taille sur un séquenceur à capillaires. La communauté microbienne est caractérisée par la taille des fragments qui la composent ainsi que par leur intensité mesurée par la hauteur des pics. L'analyse T-RFLP fournit ainsi une évaluation semi quantitative de la structure de la communauté en révélant l'abondance relative des composantes de cette communauté.

Cette méthode très sensible a été développée pour révéler la structure des communautés bactériennes des environnements naturels ou anthropisés (Moeseneder *et al.*, 1999; Braker *et al.*, 2001). Des efforts méthodologiques ont ensuite permis de proposer cette approche pour caractériser également la structure des communautés fongiques (Lord *et al.*, 2002; Edel-Hermann *et al.*, 2004) et également celle d'autres composantes

Figure 2: Représentation schématique de la procédure d'analyse par T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) du polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux de séquences d'ADN amplifiées par PCR à l'aide d'une amorce marquée par un fluorochrome et digérées par une enzyme de restriction (d'après Gruntzig *et al.*, 2002).

Figure 2: Graphical presentation of the T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) procedure for analysis of length polymorphism of terminal restriction DNA fragments after PCR amplification with fluorochrome labelled primer and digestion with restriction enzyme (after Gruntzig *et al.*, 2002).



du biota comme les protozoaires et les nématodes (Edel-Hermann *et al.*, 2008). Cette approche permet en particulier d'apprécier la dynamique d'évolution de ces structures sous l'influence de facteurs externes, là encore naturels ou d'origines anthropiques (Pérez-Piqueres *et al.*, 2006), et éventuellement d'identifier les groupes microbiens associés ou impliqués dans la réponse de la microflore (Marschner *et al.*, 2003; Nagashima *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2005). L'identification des microorganismes par séquençage et recherche d'homologie dans des banques de séquences n'est cependant pas possible directement et nécessite une étape de clonage (Marsh, 1999; Mengoni *et al.*, 2002). Enfin, une surestimation de la diversité est possible si la digestion par les enzymes de restriction est incomplète, et les résultats sont difficilement comparables si les enzymes de restriction sont différentes.

Outre son niveau de résolution important, la T-RFLP réalisée sur séquenceur à capillaires fournit des données numériques qui constituent une base de données dans laquelle sont stockés tous les profils permettant des comparaisons d'échantillons issus d'analyses indépendantes ou de prélèvements réalisés au cours du temps.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Echantillons de terre analysés

Les échantillons de sol et de racines ont été prélevés sur le dispositif expérimental de Feucherolles entre septembre 2004 et octobre 2006 (Houot *et al.*, 2009). Les analyses ont porté sur des échantillons de terre de 3 parcelles différentes (pour Témoin) ou de 4 parcelles différentes pour les 3 autres traitements, soit au total 15 parcelles de sol. Les parcelles étaient plantées avec du maïs en 2005 et du blé en 2006. Le code de ces parcelles est indiqué ci-dessous entre parenthèses.

T-N: Témoin sans azote (208, 309, 410)

T+N: Témoin fertilisé (102, 205, 303, 404)

OMR+N: Apport de compost d'ordures ménagères résiduelles + fertilisation (103, 202, 301, 405)

DVB+N: apport de compost de déchets verts et boue + fertilisation (104, 201, 305, 401)

Le calendrier de prélèvement des échantillons et la nomenclature des dates sont les suivants:

Prélèvement	Date du prélèvement	
T0	1/09/2004	Avant le 1 ^{er} épandage
T1	28/10/2004	2 mois après l'épandage
T2	12/04/2005	7 mois après l'épandage
T3	14/06/2005	9 mois après l'épandage
T4	17/10/2005	13 mois après l'épandage
T5	1/09/2006	24 mois après l'épandage
T6	21/10/2006	2 mois après un 2 ^e épandage

A chacune des 7 dates, les 15 parcelles ont fait l'objet d'un

prélèvement. Ces prélèvements de terre (échantillon moyen à partir de plusieurs sous-échantillons) ont été tamisés à 2 mm et homogénéisés sur place, répartis en flacons de 150 g (3 flacons par laboratoire et par échantillon). Ils ont été congelés le plus rapidement possible et envoyés congelés aux trois laboratoires.

Validation inter-laboratoires

L'échantillonnage et la conservation des échantillons avant analyse sont des étapes cruciales pour la validité des résultats de celle-ci. L'analyse de la structure des communautés microbiennes par les deux techniques mentionnées a été effectuée sur un échantillon moyen par parcelle. Compte tenu des différences entre les protocoles d'extraction des différents laboratoires, protocoles déjà homogénéisés et déjà validés au niveau de chaque laboratoire, et des différentes techniques d'analyse de l'ADN extrait, une validation inter-laboratoires s'est révélée nécessaire. Elle a été réalisée à partir des 3 échantillons du 2^e prélèvement (T₁) (T+N₂O₅, OMR301 et DVB201). Elle a consisté en une extraction en triplicat, par chacun des 3 laboratoires impliqués dans l'étude, de l'ADN des trois échantillons, reçus congelés, suivie de l'analyse des communautés microbiennes dans ces extraits, ainsi que dans les extraits provenant des deux autres laboratoires, reçus précipités dans l'éthanol. Chaque laboratoire a donc analysé 27 échantillons (3 extraits x 3 laboratoires x 3 réplicats) par ses propres techniques: PCR-TTGE au LIMOS et à l'UHA et PCR-T-RFLP au MSE.

Extraction d'ADN du sol

L'extraction de l'ADN du sol est une étape délicate et déterminante pour le succès des techniques d'analyse des communautés microbiennes, comme la TTGE et la T-RFLP. Il existe un grand nombre de méthodes publiées pour extraire l'ADN (Braid *et al.*, 2003; Fortin *et al.*, 2003; Griffith *et al.*, 2000) souvent adaptées à un type d'études, mais il n'existe pas de méthode universelle et les biais relatifs aux procédures d'extraction ont été mis en évidence (Martin-Laurent *et al.*, 2001). Or la nature de l'environnement d'où sont prélevés les échantillons peut varier et nécessiter des ajustements méthodologiques. La comparaison des résultats obtenus pour différents échantillons par l'une ou l'autre de ces méthodes n'est possible que si les protocoles utilisés, depuis l'extraction de l'ADN du sol jusqu'à la séparation des fragments, sont identiques pour tous ces échantillons.

Dans le cadre de ce travail, deux protocoles d'extraction d'ADN différents, développés et employés par les différents laboratoires, ont été utilisés pour les analyses par TTGE et T-RFLP. Ces protocoles différents ont été volontairement conservés, sans souci d'homogénéisation, pour la comparaison relative des différents échantillons amendés ou non en PRO.

Pour la TTGE, le protocole d'extraction d'ADN de sol, selon le protocole de Corgié *et al.* (2004) a consisté à libérer

l'ADN présent dans un échantillon (0,5 g) par agitation en présence de 0,8 ml de tampon d'extraction et de billes de verre de tailles différentes. Ce tampon d'extraction contenait du PVPP (polyvinylpyrrolidone) et du CTAB afin de piéger une partie des contaminants organiques co-extraits avec l'ADN. A l'issue de cette étape, l'ADN extrait, en solution dans le tampon, a été purifié par séparation de phase en présence d'un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique, suivie d'une précipitation en présence d'isopropanol. Le culot d'ADN est séché puis resuspendu dans 100 µl de tampon. L'ADN ainsi obtenu a été ensuite analysé par électrophorèse sur gel d'agarose afin d'évaluer sa quantité et sa qualité et a servi de matrice pour l'amplification par PCR.

Pour la T-RFLP, l'extraction a été réalisée à partir d'un gramme de sol selon la méthode décrite par Edel-Hermann *et al.* (2004). L'extraction est réalisée par agitation du sol en présence de 4 ml de tampon d'extraction (Tris, EDTA, NaCl, SDS) et de billes de verre de tailles différentes, suivie d'une précipitation en présence d'isopropanol puis de passages successifs sur deux colonnes de compositions différentes (PVPP puis Sépharose 4B). Ces étapes aboutissent à l'obtention d'une suspension contenant l'ADN total mais également de nombreuses impuretés d'origine tellurique. Dans le cas des échantillons du sol de Feucherolles, une purification en deux temps s'est avérée absolument nécessaire à ce stade de la procédure. La suspension « brunâtre » d'ADN a été d'abord passée sur une colonne de PVPP qui retient les substances humiques contenues dans la suspension. Cette étape de purification a été répétée. Puis l'éluat a été passé sur une colonne Geneclean® qui adsorbe l'ADN et permet d'éliminer les impuretés restantes. L'ADN a été ensuite élué avec un tampon, quantifié sur gel d'agarose par comparaison à une gamme d'ADN de thymus de veau et aliquoté (5ng/µl) pour être conservé à -20 °C.

Analyse des champignons mycorrhiziens dans les racines

Au printemps 2005, les parcelles expérimentales du site de Feucherolles ont été cultivées avec du maïs. Au temps T3 (juin 2005, 9 mois après épandage) et T4 (octobre 2005, 13 mois après épandage), 3 échantillons de racines par parcelle ont été prélevés et stockés à -20 °C. L'ADN génomique végétal et fongique présent dans ces échantillons a été extrait à l'aide d'un kit d'extraction commercial (Qiagen). Un fragment de l'ADN ribosomique 18S des champignons mycorrhiziens à arbuscules présents dans l'extrait a été amplifié par PCR grâce aux amorces AM1 et NS31 (Helgason *et al.*, 1998) et analysé par PCR-TTGE (Sonjak *et al.*, 2009). La présence et la position des bandes sur le gel d'électrophorèse ont été notées et analysées. Les résultats sont présentés par une analyse en composantes principales (ACP).

Analyse par TTGE

Pour l'analyse des champignons présents dans les sols, le fragment d'ADN ciblé fait partie de l'ADNr 18S. Le fragment analysé par TTGE est le produit de 2 PCR successives. La première PCR utilise les amorces MH2 et MH4 (Vandenkoornhuysse et Leyval, 1998) dont les séquences sont: MH2: 5'-TTCGATGGTAGGATAGAGG-3' et MH4: 5'-GTCTACTAAGCCATTC-3'. La seconde PCR (PCR nichée) est réalisée à partir des produits de la première PCR et utilise les amorces GC-MH2 (amorce MH2 additionné d'un GC-clamp) et TTGE 2 dont la séquence est: TTGE2: 5'-ATCCTAGAAACCAACAAAATA-3'. Après avoir vérifié la qualité et la quantité des amplicons ainsi obtenus par électrophorèse sur gel d'agarose, ces amplicons (550 pb) sont analysés par TTGE. La TTGE est réalisée sur gel d'acrylamide à 6 % en conditions partiellement dénaturantes (6 M d'urée). La migration est réalisée à 130V entre 54,5°C et 59°C à raison de 0,7°C.h⁻¹. Après coloration au bromure d'éthidium, une image digitale du gel est réalisée. Grâce à cette image, la présence et la position des bandes sur le gel d'électrophorèse sont notées et analysées. Les résultats sont présentés par une analyse en composantes principales (ACP).

Pour l'analyse des champignons mycorrhiziens présents dans les racines de maïs prélevées en 2005, le fragment d'ADN ciblé fait également partie de l'ADNr 18S et est aussi le produit de 2 PCR successives. Le gel d'acrylamide et les conditions de migration de la TTGE sont les mêmes que celles utilisées pour les champignons présents dans le sol.

Pour l'analyse des bactéries présentes dans les sols, le fragment d'ADN ciblé fait partie de l'ADNr 16S. Le fragment analysé par TTGE est le produit d'une seule PCR. Cette PCR utilise les amorces GC-968f (Feslke *et al.*, 1998) (968f additionné d'un GC-clamp) et 1401r (Heuer *et al.*, 1999) dont les séquences sont: 968f : 5'-AACGCGAAGAACCCTTAC-3' et 1401r: 5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3'. Comme précédemment, après avoir vérifié la qualité et la quantité des amplicons ainsi obtenus par électrophorèse sur gel d'agarose, ces amplicons (475 pb) sont analysés par TTGE. La TTGE est réalisée sur gel d'acrylamide à 6 % en conditions partiellement dénaturantes (8 M d'urée). La migration est réalisée à 145V entre 57°C et 63°C à raison de 0,7°C.h⁻¹. Après coloration au bromure d'éthidium, une image digitale du gel est réalisée. La présence et la position des bandes sur le gel d'électrophorèse ont été notées et analysées.

Analyse par T-RFLP

Cette technique a été utilisée avec succès pour préciser, dans deux études différentes, l'impact d'apports de matières organiques sur la qualité phytosanitaire de sols agricoles (Perez-Piquères *et al.*, 2006; Steinberg *et al.*, 2004). Elle a montré l'intérêt de prendre en compte simultanément la réponse des communautés bactériennes et des communautés fongiques

pour proposer des hypothèses quant à leurs rôles respectifs dans la suppression de certaines maladies dues à des champignons phytopathogènes d'origine tellurique.

Pour les champignons, l'ADNr 18S est ciblé. Deux amorces ont été utilisées, dont une est marquée en 5' avec le Dye Beckman D3 (Proligo). Ces amorces sont: nu-SSU-0817-5' (F): 5'-(D3)-TTAGCATGGAATAATRRRAATAGGA-3' (R = G ou A) et nu-SSU-1536-3' (R): 5'-ATTGCAATGCYCTATCCCCA-3' (Y = C ou T) (Borneman et Hartin, 2000). Des problèmes d'efficacité de PCR d'ADNr 18S à partir de l'ADN du sol de Feucherolles ont conduit à modifier la procédure de T-RFLP initialement développée, en utilisant comme amorce marquée avec le fluorochrome D3 l'amorce sens nu-SSU-0817-5' et non pas l'amorce réverse nu-SSU-1536-3' (Edel-Hermann et al., 2004). Pour les bactéries, la même procédure est utilisée mais les amorces sont: 27F: 5'-(D3)-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' et 1392R: 5'-ACGGGCGGTGTGTACA-3'. La réussite de l'amplification est vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose. L'excès d'amorces et autres solutés présents peut perturber l'analyse ultérieure du polymorphisme et nécessite une purification sur colonnes MinElute (Qiagen). Les produits de PCR purifiés sont quantifiés sur gel d'agarose par comparaison à une gamme de Smart Ladder (Eurogentec) pour répondre aux conditions nécessaires à la digestion par une enzyme de restriction (*HaeIII* dans le cas de l'ADNr 16S des bactéries, et *MspI* dans le cas de l'ADNr 18S des champignons). Le choix de l'enzyme de restriction utilisée a été effectué sur la base d'une comparaison de séquences d'ADNr pour chacun des groupes de microorganismes (Edel-Hermann et al., 2004). A l'issue de la phase de digestion, les échantillons sont précipités, repris dans un tampon, et analysés à l'aide du séquenceur à capillaires CEQ™ 2000XL (Beckman Coulter) en présence d'un standard de taille interne (size standard 600 Beckman). Ils sont déposés dans une plaque de 96 puits adaptée au séquenceur. Chaque analyse comprend un multiple de 8 échantillons déposés dans une colonne de la plaque. Les produits de la digestion d'un échantillon sont distribués dans 3 puits pour pallier l'éventuel défaut d'annotation d'un pic par le séquenceur, problème rencontré lorsqu'il y a abondance de pics (polymorphisme important au sein de la communauté analysée).

Le séquenceur fournit un électrophorégramme représentant les pics du standard et les pics de l'échantillon analysé (figure 2). Chaque pic représente des fragments d'une longueur donnée, déterminée en comparaison au standard, et leur abondance relative est révélée par l'intensité de fluorescence comparée à la fluorescence totale.

Des outils d'analyse des données ont été développés sous Excel® pour prendre en compte la variabilité liée au problème d'annotation des pics très nombreux obtenus dans le cas des échantillons du sol de Feucherolles pour la caractérisation de la structure génétique des communautés bactériennes.

Analyse des données par ACP

Les données de TTGE (présence/absence des bandes) et de T-RFLP (pics) ont été analysées par Analyse en Composantes Principales (ACP) à partir de matrices de covariance. La structure génétique de la communauté microbienne révélée par l'analyse TTGE ou T-RFLP d'un échantillon est représentée par la projection d'un point sur un plan factoriel. La position relative des points représentatifs des différents échantillons permet d'apprécier la variabilité entre les répétitions et les différences éventuelles entre les traitements.

RÉSULTATS

Validation inter-laboratoires

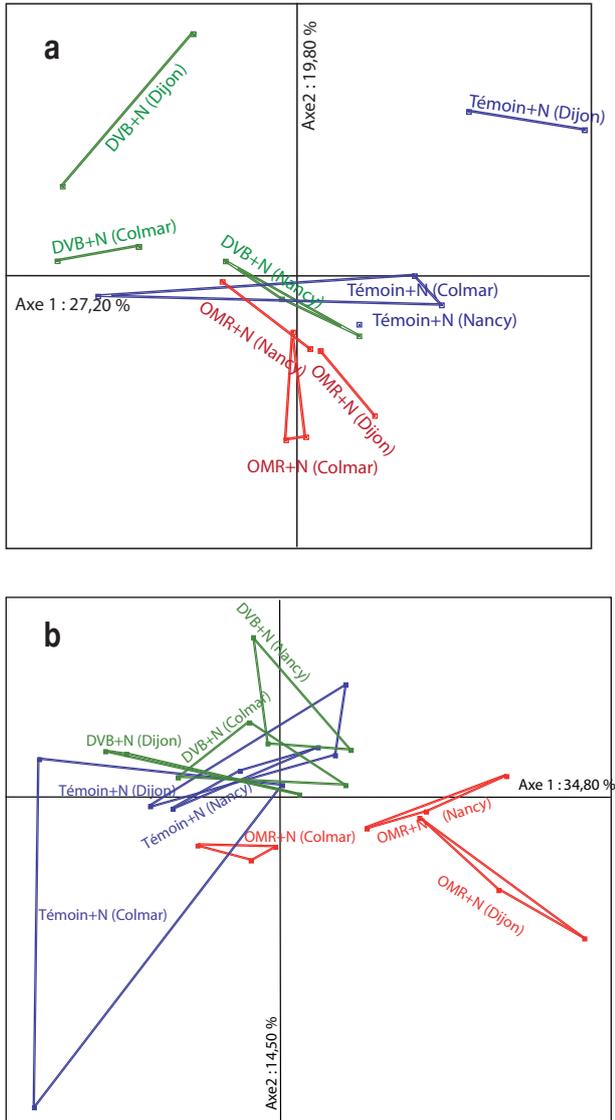
L'analyse en composantes principales des communautés fongiques présentes dans les échantillons utilisés lors de la validation inter-laboratoires montre une bonne reproductibilité des répétitions selon le laboratoire au sein duquel l'extraction des acides nucléiques a été réalisée (Colmar, Dijon ou Nancy) (figure 3a). Pour les différents traitements analysés (T+N, OMG+N et DVB+N), la plus grande discrimination est observée pour les extraits provenant de Dijon. Dans le cas des échantillons provenant de Colmar et Nancy, même si cette discrimination est moins forte, elle tend à séparer les trois traitements OMG+N, T+N et DVB+N pour Colmar, et à discriminer OMG des deux autres traitements à Nancy. Toutefois, on observe un recouvrement de certains échantillons provenant de traitements différents et d'origines différentes comme les échantillons DVB+N-Nancy et T+N-Colmar par exemple. L'analyse des communautés fongiques des mêmes échantillons par PCR-T-RFLP (figure 3b) a aussi montré une bonne répétabilité entre les 3 répétitions d'un même échantillon obtenues avec la même méthode d'extraction, mais une structure des communautés différente en fonction de la méthode d'extraction. Concernant les communautés bactériennes, une bonne répétabilité entre les répétitions a été également observée (données non présentées). En revanche, les résultats ne sont pas reproductibles, sans doute parce qu'en plus de l'effet « expérimentateur » ou « laboratoire », les conditions d'analyse des échantillons diffèrent. Ainsi, l'analyse de l'ensemble des données montre une discrimination des échantillons en fonction du laboratoire qui a fait l'extraction aussi bien qu'en fonction des traitements et ne permet pas de conclure quant à l'effet des traitements.

Analyse de la structure de la communauté fongique dans le sol

Les résultats obtenus par TTGE sont présentés (figure 4). Aux différents temps de prélèvement, au total 19 espèces différentes

Figure 3: Analyse en composantes principales de la structure de la communauté fongique estimée par a) PCR-TTGE et b) T-RFLP lors de la campagne de validation inter-laboratoires.

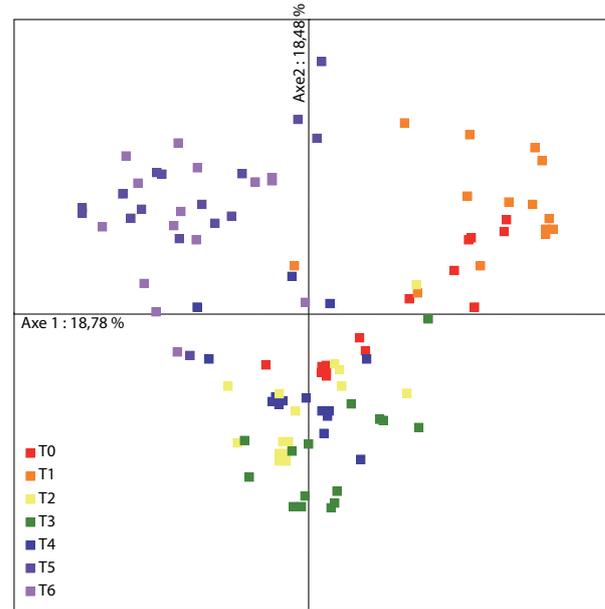
Figure3: Principal component analysis of fungal community structure estimated by a) PCR-TTGE and b) T-RFLP within the inter-laboratory validation.



de champignons ont été détectées dans les échantillons de sol et entre 6 et 12 espèces selon les échantillons. L'analyse des données de chaque prélèvement ne montre pas de discrimination claire entre les échantillons des différents traitements. Le regroupement de l'ensemble des données de tous les traitements et de tous les temps de prélèvements sur une même ACP fait cependant apparaître une évolution temporelle de la structure de la communauté fongique. Ainsi, on

Figure 4: Analyse en composantes principales de la structure de la communauté fongique du sol de Feucherolles estimée par PCR-TTGE, regroupant les données de tous les traitements et tous les temps de prélèvements.

Figure 4: Principal component analysis of fungal community structure in Feucherolles soil estimated by PCR-TTGE, taking into account the data of all treatments and all sampling dates.



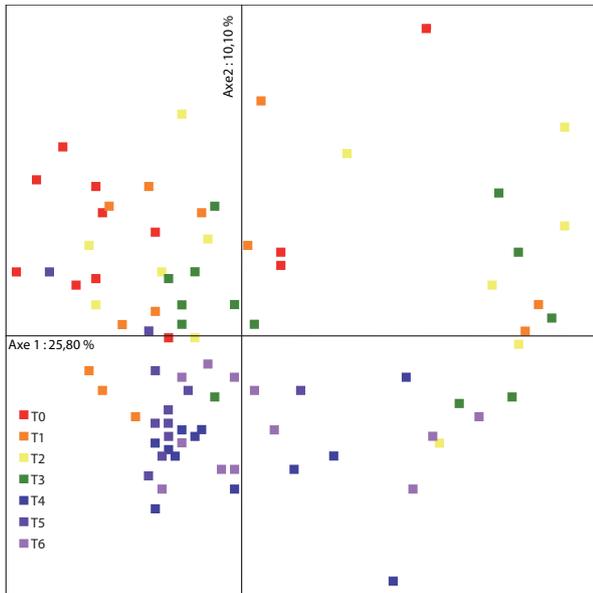
note, par rapport au T0, un déplacement des échantillons vers la droite suite à l'épandage (T1), puis un regroupement de ceux correspondant aux échantillons de 2005 (T2, T3, T4), ensuite une évolution (entre T3, T4 et T5) vers les échantillons de 2006, avec cette fois un effet moins net du nouvel épandage (T6 par rapport à T5). Si les résultats de l'analyse faite par T-RFLP ne sont pas strictement les mêmes, en revanche leur analyse conduit aux mêmes conclusions (données non présentées).

Analyse de la structure de la communauté bactérienne dans le sol

En ce qui concerne la communauté bactérienne, des conclusions similaires ont été obtenues, que l'analyse de la communauté ait été réalisée par TTGE ou par T-RFLP, et par l'un ou l'autre des laboratoires. Les analyses réalisées sur les différents prélèvements, dont un exemple obtenu par T-RFLP est présenté (figure 5), montrent une structuration de la communauté bactérienne dans le temps ($P < 0,001$) mais pas de différenciation des traitements témoins et amendés.

Figure 5: Analyse en composantes principales de la structure de la communauté bactérienne du sol de Feucherolles estimée par PCR-T-RFLP, regroupant les données de tous les traitements et tous les temps de prélèvements.

Figure 5: Principal component analysis of bacterial community structure in Feucherolles soil estimated by PCR-T-RFLP, taking into account the data of all treatments and all sampling dates.



Analyse de la structure de la communauté de champignons mycorhiziens dans les racines de maïs par TTGE

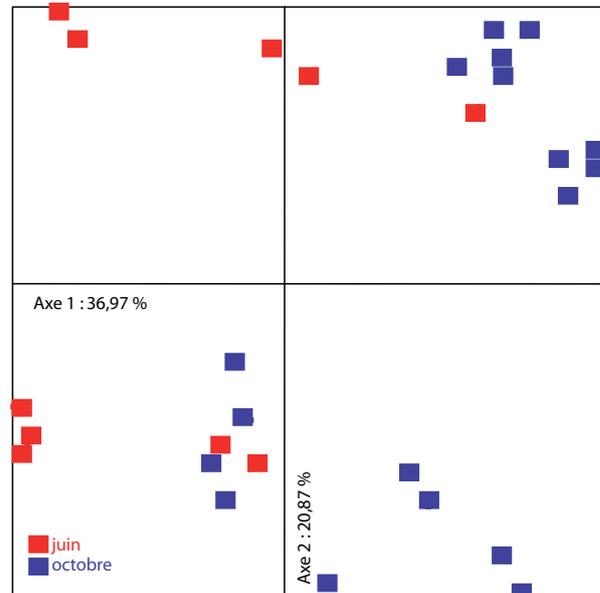
Aux deux temps de prélèvement, entre 5 et 8 espèces de champignons mycorhiziens ont été détectées dans les racines de maïs avec une moyenne de 5 espèces par échantillon pour ceux récoltés au mois de juin et une moyenne de 6 pour ceux du mois d'octobre. La comparaison de la structure de la communauté mycorhizienne observée montre que celle-ci est très proche pour un temps de prélèvement quel que soit le traitement étudié (figure 6). Ainsi, les résultats montrent surtout une discrimination de la structure de la communauté mycorhizienne en fonction de la saison. Des groupes semblent discriminés en fonction de l'axe horizontal, mais ils ne correspondent pas à des traitements ou à des répétitions particuliers.

DISCUSSION

La campagne de validation inter-laboratoires a permis i) d'appréhender l'hétérogénéité des échantillons, la répétabilité et la reproductibilité des techniques développées, ii) de comparer les résultats obtenus par différentes techniques

Figure 6: Analyse en composantes principales de la structure de la communauté de champignons mycorhiziens, dans les racines de maïs prélevées sur le site de Feucherolles aux temps T3 et T4 et estimée par PCR-TTGE.

Figure 6: Principal component analysis of the community structure of mycorrhizal fungi in maize roots sampled in Feucherolles soil at T3 and T4 and estimated by PCR-TTGE.



(TTGE, T-RFLP) et par la même technique menée dans des laboratoires différents. On peut constater que les trois répétitions (trois extractions d'ADN) d'un même échantillon donnent des résultats souvent très proches, voire identiques en termes de structure des communautés, quelle que soit la technique d'extraction ou le laboratoire concerné, et qu'il s'agisse des bactéries ou des champignons. Toutefois, pour d'autres échantillons, on note des différences plus importantes entre les répétitions, ce qui d'une part souligne les limites de la méthode et incite à réaliser systématiquement des répétitions techniques et d'autre part suggère une hétérogénéité de la structure des communautés bactériennes à l'échelle de l'échantillon (0,5 à 1g de sol).

Toutefois, cette étude montre que les résultats obtenus avec les différentes techniques d'extraction d'acides nucléiques à partir du sol, utilisées dans différents laboratoires, peuvent être sensiblement différents, et ne peuvent pas être comparés directement. En revanche, les résultats obtenus par un laboratoire à partir d'une technique d'extraction conduisent aux mêmes conclusions que celles obtenues dans un autre laboratoire utilisant d'autres techniques. Ainsi, dans le cas présent, les résultats obtenus dans chacun des laboratoires utilisant ses propres techniques permettent de discriminer de

manière comparable différentes communautés microbiennes et aboutissent à des conclusions identiques.

Aucune réponse de la microflore aux amendements organiques n'a été mise en évidence dans cette étude, quelle que soit la technique employée, qu'il s'agisse des bactéries ou des champignons incluant les champignons mycorrhizogènes. Par contre, les structures génétiques des communautés bactériennes et fongiques évoluent dans le temps, et ceci pendant les deux années d'étude. Il apparaît clairement que l'analyse de la structure des communautés microbiennes est un révélateur du comportement du biota dans le sol mais que la causalité des variations est difficile à identifier dans l'agro-écosystème. C'est pourquoi les résultats relatifs aux communautés microbiennes doivent être associés à ceux de paramètres agronomiques des parcelles. Des analyses statistiques de type corrélations multiples, co-inerties devraient permettre d'identifier les paramètres pouvant jouer le rôle d'indicateurs, mais il est certain que c'est d'un ensemble de paramètres que cette notion peut se dégager et non pas d'un seul.

Les résultats montrent que les communautés bactériennes et fongiques du sol du site de Feucherolles semblent stables et peu influencées par les traitements (OMR+N, DVB+N, T+N), ou que l'effet des traitements est masqué par d'autres effets comme un effet temporel ou une variabilité spatiale. Les techniques de PCR-TTGE et de PCR-T-RFLP utilisées ici ne permettent de suivre que les espèces ou populations microbiennes majoritairement représentées dans les échantillons. Ce travail montre donc que les amendements utilisés ici ne perturbent pas ces populations dominantes dans ces sols, mais il est possible que des espèces peu représentées le soient par ailleurs. En effet, des résultats similaires obtenus sur des sols agricoles en Autriche (étude portant sur 12 ans) montrent que la structure des communautés bactériennes analysée par DGGE ne semble pas affectée par la nature des composts, incluant des PRO, apportés alors que le profil physiologique de ces communautés, analysé par la méthode Biolog, l'était de manière significative (Ros *et al.*, 2006). Pour expliquer plus clairement le rôle des PRO sur le fonctionnement biologique du sol, et pour identifier d'éventuels indicateurs microbiens de l'impact de ces PRO, il apparaît nécessaire de cibler les populations non dominantes ou de cibler des communautés fonctionnelles, par exemple celles associées à la décomposition des différentes matières organiques ou à la biodégradation de composés particuliers apportés dans les amendements en utilisant par exemple les puces à ADN (Danon *et al.*, 2008; Franke-Whittle *et al.*, 2009). On peut également supposer que des épandages avec des amendements qui imposent des contraintes plus fortes modifieraient de manière plus importante ces communautés du sol. Avec la même méthode d'analyse de la communauté fongique, des modifications importantes de la structure de cette communauté ont ainsi été observées dans le cas de sols provenant de friches industrielles avec des pollutions massives

par des substances organiques comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Norini, 2007).

En revanche, les structures génétiques des communautés bactériennes et fongiques évoluent dans le temps, et ceci pendant les deux années d'étude. Ce facteur temps qui conditionne la structuration des communautés microbiennes peut être lié aux variations saisonnières (conditions climatiques), mais également aux cultures, ainsi qu'aux pratiques liées à ces cultures (Stark *et al.*, 2007). Il est également possible que les doses apportées régulièrement au sol (tous les 2 ans) soient peu perturbatrices en regard de ces autres facteurs exogènes. Par ailleurs, l'étude s'est inscrite dans une dynamique initiée plusieurs années auparavant. Un effet perturbateur à court terme (0-6 mois) des différentes MO, souvent rapporté (Pérez Piqueres *et al.*, 2006; Valarini *et al.*, 2003), a pu se produire lors des premiers apports mais disparaître ensuite. Ainsi, la réponse des communautés microbiennes aux différents apports pourrait être plus rapide (de l'ordre du mois) et transitoire.

CONCLUSIONS

Développement considérable des outils de biologie moléculaire, depuis plusieurs décennies, a permis d'accéder aux microorganismes présents et actifs dans les sols et non plus seulement aux microorganismes cultivables. Les techniques comme la TTGE et la T-RFLP sont des méthodes sensibles, informatives et pertinentes qui permettent de comparer la structure des communautés microbiennes dans différents environnements complexes afin d'évaluer l'influence de stress sur ces communautés. Plus généralement, elles ouvrent des perspectives pour le monitoring des communautés microbiennes en relation avec les préoccupations relatives à l'agriculture durable, à la qualité des sols et aux questions environnementales. Associées à des techniques de clonage-séquençage, elles permettent également d'identifier des groupes microbiens plus directement associés à, ou impliqués dans, le fonctionnement biologique du sol (Benitez *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2006). Ces groupes microbiens pourraient être des indicateurs de la qualité des sols.

Il faut souligner toutefois que toutes ces techniques présentent des biais qu'il faut préciser et prendre en compte dans l'interprétation des résultats. Par ailleurs, une étape décisive reste l'échantillonnage et la représentativité de l'échantillon analysé. Le rendement d'extraction d'ADN par les différentes méthodes utilisées doit aussi être déterminé pour obtenir des résultats comparables et quantitatifs. Si un certain nombre de protocoles d'extraction d'ADN ont déjà été publiés, et si des kits d'extraction sont commercialisés, l'extraction d'ADN d'un sol précis, en particulier d'un sol contaminé, reste une étape cruciale et nécessite souvent une mise au point spécifique.

Dans cette étude, et dans les limites des méthodes employées, aucune réponse de la microflore bactérienne, fongique et mycorhizienne aux amendements organiques n'a été mise en évidence. Par contre, les structures moléculaires des communautés bactériennes et fongiques évoluent dans le temps au cours des deux années d'étude, et il faut souligner la cohérence des conclusions obtenues avec les différentes approches et avec les différents groupes microbiens. On peut ainsi considérer l'analyse de la structure des communautés microbiennes comme un révélateur du comportement du biota dans le sol mais la causalité des variations est difficile à identifier dans l'agro-écosystème. C'est pourquoi les résultats relatifs aux communautés microbiennes doivent être associés à ceux relatifs aux paramètres agronomiques et abiotiques des parcelles.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Veolia environnement R&D et l'ADEME pour leur soutien à ce projet.

BIBLIOGRAPHIE

- Benitez, M. S., Tustas, F. B., Rotenberg, D., Kleinhenz, M. D., Cardina, J., Stinner, D., Miller, S. A., and Gardener, B. B. M. 2007- Multiple statistical approaches of community fingerprint data reveal bacterial populations associated with general disease suppression arising from the application of different organic field management strategies. *Soil Biology & Biochemistry*, 39, pp. 2289-2301.
- Boivin M. E. Y., Greve G. D., Kools S. A. E., van der Wurff A. W. G., Leeflang P., Smit E., Breure A. M., Rutgers M., and van Straalen N. M., 2006 - Discriminating between effects of metals and natural variables in terrestrial bacterial communities. *Applied Soil Ecology*, 3, pp.103-113.
- Borneman J., Hartin R.J., 2000 - PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, pp. 4356-4360.
- Braid M. D., Daniels L. M., Kitts C. L. , 2003 - Removal of PCR inhibitors from soil DNA by chemical flocculation. *Journal of Microbiology Methods*, 52, pp. 389-393.
- Braker G., Ayala-Del-Rio H.L., Devol A.H., Fesefeldt A., Tiedje J.M., 2001 - Community structure of denitrifiers, *Bacteria*, and *Archaea* along redox gradients in Pacific Northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (*nirS*) and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, pp. 1893-1901.
- Brandt K. K., Petersen A., Holm P. E., and Nybroe O., 2006 - Decreased abundance and diversity of culturable *Pseudomonas* spp. populations with increasing copper exposure in the sugar beet rhizosphere. *Fems Microbiology Ecology* 56, pp. 281-291.
- Centofanti T., Hollis J. M., Blenkinsop S., Fowler H. J., Truckell I., Dubus I. G., and Reichenbeyer S., 2008 - Development of agro-environmental scenarios to support pesticide risk assessment in Europe. *Science of the Total Environment*, 407, pp. 574-588.
- Corgie S.C., Beguiristain T., Leyval C. 2004 - Spatial distribution of bacterial communities and phenanthrene degradation in the rhizosphere of *Lolium perenne* L. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, pp. 3552-3557.
- Danon M., Franke-Whittle I. H., Insam H., Chen Y. and Hadar Y., 2008 - Molecular analysis of bacterial community succession during prolonged compost curing. *Fems Microbiology Ecology*, 65, pp. 133-144.
- Dice LR., 1945 - Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26, pp. 297-302.
- Dickie I.A., Xu B. and Koide R.T., 2002 - Vertical niche differentiation of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP analysis. *New Phytol.*, 156, pp. 527-535.
- Edel-Hermann V., Dreumont C., Perez-Piqueres A., Steinberg C., 2004 - Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of ribosomal RNA genes to assess changes in fungal community structure in soils. *Fems Microbiol. Ecol.*, 47, pp. 397-404.
- Edel-Hermann V., Gautheron N., Alabouvette C., and Steinberg C., 2008 - Fingerprinting methods to approach multitrophic interactions among microflora and microfauna communities in soil. *Biology and Fertility of Soils*, 44, pp. 975-984.
- Felske A., Akkermans A. D. L. and De Vos W. M., 1998 - Quantification of 16S rRNA in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, pp. 4581-4587.
- Fortin N., Deaumier D., Lee K., Greer C. W., 2003 - Soil washing improves the recovery of total community DNA from polluted and high organic content sediments. *J. Microbiol. Methods*, 56, pp. 181-191.
- Franke-Whittle I. H., Knapp B. A., Fuchs J., Kaufmann R. and Insam H., 2009 - Application of COMPOCHIP microarray to investigate the bacterial communities of different composts. *Microbial Ecology*, 57, pp. 510-521.

- Gelsomino A., Keijzer-Wolters A.C., Cacco G., van Elsas J.D., 1999 - Assesment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Methods*, 38, pp. 1-15.
- Griffiths R.I., Whiteley A.S., O'Donnell A.G., Bailey M.J., 2000 - Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA based microbial community composition. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, pp. 5488-5491.
- Grüntzig V., B. Stres, H. L. Ayala del Rio, and J. M. Tiedje, 2002 - Center for Microbial Ecology, Michigan State University, East Lansing, Michigan, 48824, http://rdp8.cme.msu.edu/html/t-rflp_jul02.html
- Helgason T., Daniell T.J., Husband R., Fitter A.H., Young J.P.W., 1998 - Ploughing up the wood-wide web? *Nature*, pp. 394-431.
- Heuer H., Hartung K., Wieland G., Kramer I. and Smalla K., 1999 - Polynucleotide probes that target a hypervariable region of 16S-RNA genes to identify bacterial isolates corresponding to bands of community fingerprints. *Applied and Environment Microbiology*, 65, pp. 1045-1049.
- Houot S., Cambier Ph., Benoit P., Deschamps M., Jaulin A., Lhoutellier C. et Barriuso E., 2009 - Effet d'apports de composts sur la disponibilité de micropolluants métalliques et organiques dans un sol cultivé. *Etude et Gestions des Sols*, vol. 16/3-4, 255-274
- Janvier C., Villeneuve F., Alabouvette C., Edel-Hermann V., Mateille T. and Steinberg C., 2007 - Soil health through soil disease suppression: which strategy from descriptors to indicators? *Soil Biology & Biochemistry*, 39, pp. 1-23.
- Kiikkilä, O., Perkiömäki, J., Barnette, M., Derome, J., Pennanen, T., Tulisalo, E., Fritze, H., 2001 - In situ bioremediation through mulching of soil polluted by a copper-nickel smelter. *J. Environ. Qual.*, 30, pp.1134-1143.
- Lazzaro, A., Hartmann, M., Blaser, P., Widmer, F., Schulin, R. and Frey B., 2006. Bacterial community structure and activity in different Cd-treated forest soils. *Fems Microbiology Ecology*, 58, pp. 278-292.
- Lejon D. P. H., Martins J. M. F., Leveque J., Spadini, L., Pascault, N., Landry, D., Milloux, M. J., Nowak, V., Chaussod, R., and Ranjard, L. 2008 - Copper dynamics and impact on microbial communities in soils of variable organic status. *Environmental Science & Technology*, 42, pp. 2819-2825.
- Leyval C., Binet P., 1998 - Effect of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) in soil on arbuscular mycorrhizal colonization of plants. *J. Environ. Qual.*, 27, pp. 402-407.
- Leyval C., Turnau, K., Haselwandter K., 1997 - Interactions between heavy metals and mycorrhizal fungi in polluted soils: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza*, 7, pp. 139-153.
- Liu W.-T., Marsh T.L., Cheng H., Forney L.J., 1997 - Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, pp. 4516-4522.
- Lord N.S., Kaplan C.W., Shank P., Kitts C.L., Elrod S.L., 2002 - Assessment of fungal diversity using terminal restriction fragment (T-RF) pattern analysis: comparison of 18S and ITS ribosomal regions. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 42, pp. 327-337.
- Lu Y. H., Rosencrantz D., Liesack W., and Conrad R., 2006 - Structure and activity of bacterial community inhabiting rice roots and the rhizosphere. *Environmental Microbiology*, 8, pp. 1351-1360.
- Maarit-Niemi R., Heiskanen I., Wallenius K. and Lindstrom K., 2001 - Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *J. Microbiol. Methods*, 45, pp. 155-165.
- Marschner P., E. Kandeler, B. Marschner., 2003 - Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biol. Biochem.*, 35, pp. 453-461.
- Marsh T.L., Saxman P., Cole J. Tiedje, J., 2000 - Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, pp. 3616-3620.
- Marsh T.L., 1999 - Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current Opinion in Microbiology*, 2, pp. 323-327.
- Martin-Laurent F., Philippot L., Hallet S., Chaussod R., Germon J.C., Soulas G., Catroux G., 2001 - DNA extraction from soils: Old bias for new microbial diversity analysis methods *Appl. Environ. Microbiol.* 67, pp. 2354-2359.
- Mazzola M., 2004 - Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. *Annual Review of Phytopathology*, 42, pp. 35-59.
- Mengoni A., Grassi E., Bazzicalupo M., 2002 - Cloning method for taxonomic interpretation of T-RFLP patterns. *Biotechnique*, 33, pp. 990-992.
- Miller K.M., Ming T.J., Schulze A.D., Withler R.E., 1999 - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE): a rapid and sensitive technique to screen nucleotide sequence variation in populations. *BioTechniques*, 27, pp. 1016-1030.
- Moeseeder M.M., Arrieta J.M., Muyzer G., Winter C., Herndl G.J., 1999 - Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, pp. 3518-3525.
- Muyzer G. Waal E.C.D. and Uitterlinden A.G., 1993 - Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified gene coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, pp. 695-700.
- Muyzer G., 1999 - DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 2, pp. 317-322.
- 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, pp. 127-141.
- Nagashima K., Hisada T., Sato M., Mochizuki J., 2003 - Application of new primer-enzyme combinations to terminal restriction fragment length polymorphism profiling of bacterial populations in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, pp. 1251-1262.
- Norini M.P., 2007 - Ecodynamique des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et des communautés microbiennes dans des sols à pollution mixte (HAP, métaux) avant et après traitement par biopile et par désorption thermique: influence de la rhizosphère et de la mycorrhization. Thèse de doctorat de Nancy Université, 243 pages.
- Pérez-Piqueres A., Edel-Hermann V., Alabouvette C. and Steinberg C. 2006 - Response of soil microbial communities to compost amendments. *Soil Biology & Biochemistry*, 38, pp. 460-470.
- Prosser J. I., 2002 - Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. *Plant and Soil*, 244, pp. 9-17.
- 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. *Environ. Microbiol.* 5, pp. 1111-1120.
- Rasmussen L.D., Ekelund F., Hansen L.H., Sorensen S.J., Johnsen K., 2001 - Group-specific PCR primers to amplify 24S α -subunit rRNA genes from kinetoplastida (protozoa) used in denaturing gradient gel electrophoresis. *Microbiol. Ecol.*, 42, pp. 109-115.
- Ros M., Klammer S., Knapp B., Aichberger K. and Insam H., 2006 - Long-term effects of compost amendment of soil on functional and structural diversity and microbial activity. *Soil Use and Management*, 22, pp. 209-218.
- Saison C., Waller N. J., Kumar A. and Kookana R. S., 2009 - Effects of thiobencarb in combinations with molinate and chlorpyrifos on selected

- soil microbial processes. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 44, pp. 226-234.
- Sheppard S.K., McCarthy A.J., Loughnane J.P., Gray N.D., Head I.M., Lloyd D., 2005 - The impact of sludge amendment on methanogen community structure in an upland soil. *Appl. Soil Ecol.*, 28, pp. 2 147-162
- Smith SE, Read D J., 1997 - *Mycorrhizal Symbiosis*. San Diego, Academic Press
- Sonjak S, Beguiristain T., Leyval C. and Regvar M., 2009 - Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with selected plants from saline and metal polluted environments. *Plant and Soil*, 314, pp. 25-34.
- Stark C., Condon L. M., Stewart A., Di H. J. and O'Callaghan M., 2007 - Influence of organic and mineral amendments on microbial soil properties and processes. *Applied Soil Ecology*, 35, pp. 79-93.
- Steinberg C., Edel-Hermann V., Guillemaut C., Pérez-Piqueres A., Singh P. and Alabouvette C., 2004 - Impact of organic amendments on soil suppressiveness to diseases. In *Multitrophic interactions in soil and integrated control*, edited by R. A. Sikora, S. Gowen, R. Hauschild and S. Kiewnick: IOBC wprs Bulletin / Bulletin OILB srop, pp. 259-266.
- Suzuki C., Kunito T., Aono T., Liu C.T., Oyaizu H., 2005 - Microbial indices of soil fertility. *J. Appl. Microbiol.*, 98, pp. 1062-1074.
- Vandenkoornhuysen P, Leyval C. 1998 - SSU rDNA sequencing and PCR-fingerprinting reveal genetic variation within *Glomus mosseae*. *Mycologia*, 90, pp. 791-797.
- Vieuble-Gonod L., Benoit P., Cohen N. and Houot S., 2007 - Spatial heterogeneity of soil microorganisms and isoproturon degrading activity in a tilled soil in relation to urban waste composts application. *Environmental fate and ecological effects of pesticides*, pp. 37-44.
- Viti C., Quaranta D., de Philippis R., Corti G., Agnelli A., Cuniglio R. and Giovannetti L., 2008 - Characterizing cultivable soil microbial communities from copper fungicide-amended olive orchard and vineyard soils. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 24, pp. 309-318.
- Wilke B. M., Riepert F., Koch C., and Kuhne T., 2008 - Ecotoxicological characterization of hazardous wastes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70, pp. 283-293.
- Zabaloy M. C., Garland J. L. and Gomez M. A., 2008 - An integrated approach, to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate, 2,4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region, Argentina. *Applied Soil Ecology*, 40, pp. 1-12.