

Apprentissage par la recherche à l'Université de Montpellier :

Etude de la biodiversité microbienne du sol de la réserve naturelle du Lunaret

M. Barbier_(1X), J. Jeanjean_(1X), E. Labadie-Lafforgue_(1X), A. Loechleiter_(1X), L. Plumet_(1X), F. Schatt_(1X), Z. Abdelli₍₁₎, S. Alary₍₁₎, H. Benzouaoui₍₁₎, D. Casi₍₁₎, S. Cornélie₍₁₎, M. Monie-Ibanes₍₁₎, M. Pierre₍₁₎, L. Pirou₍₁₎, B. Reggiardo₍₁₎, I. Surage₍₁₎, C. Teyssier_(2,*) et A. Carré-Mlouka_(3,*)

- 1) Université de Montpellier, Master Biologie-Agrosciences, parcours Interactions Microorganismes-Hôtes-Environnements (IMHE), Faculté des Sciences de Montpellier, Place E. Bataillon, 34095 Montpellier, France
- 2) Faculté de Pharmacie, UMR 95 QualiSud, Université de Montpellier, Cirad, Avignon Université, Institut Agro, IRD, Université de La Réunion, 34398 Montpellier Cedex 5, France
- 3) Faculté des Sciences, Laboratoire DGIMI, Diversité, Génomes & Interactions Microorganismes-Insectes, Université de Montpellier, UMR INRAE 1333, CC54, 34095 Montpellier Cedex 5, France

× Ces auteurs ont contribué de manière égale à la rédaction de cet article

* Auteurs correspondants : alyssa.carre-mlouka@umontpellier.fr et corinne.teyssier@umontpellier.fr

Comment citer cet article :

Barbier M., Jeanjean J., Labadie-Lafforgue E., Loechleiter A., Plumet L., Schatt F., Abdelli Z., Alary S., Benzouaoui H., Casi D., Cornélie S., Monie-Ibanes M., Pierre M., Pirou L., Reggiardo B., Surage I., Teyssier C. et Carré-Mlouka A., 2022 - Apprentissage par la recherche à l'Université de Montpellier : Etude de la biodiversité microbienne du sol de la réserve naturelle du Lunaret *Étude et Gestion des Sols*, 29, 185-197

Comment télécharger cet article :

<https://www.afes.fr/publications/revue-etude-et-gestion-des-sols/volume-29/>

Comment consulter/télécharger

tous les articles de la revue EGS :

<https://www.afes.fr/publications/revue-etude-et-gestion-des-sols/>

RÉSUMÉ

Le sol constitue un écosystème extrêmement riche et abondant en termes d'organismes microscopiques jouant un rôle majeur dans les cycles biogéochimiques. De nombreux facteurs peuvent perturber la composition de ces écosystèmes, entraînant des conséquences sur l'environnement, voire sur la santé humaine et animale. Cet article présente le travail réalisé par des étudiants du master Interactions Microorganismes Hôtes Environnement (IMHE) de l'Université de Montpellier, dans le cadre d'une approche de formation par la recherche encadrée par leurs enseignantes. Le sol de la réserve naturelle du Lunaret à Montpellier, susceptible d'être soumis à des perturbations anthropiques, a été choisi pour en étudier la diversité microbienne par une approche culturelle complétée d'une approche moléculaire. Les étudiants ont participé à l'ensemble des étapes du projet, depuis l'échantillonnage jusqu'à la rédaction de l'article, en passant par les manipulations pratiques et l'analyse des résultats.

Mots-clés

Communauté bactérienne, biodiversité, apprentissage par la recherche, approche culturelle, approche moléculaire.

SUMMARY

RESEARCH-BASED LEARNING AT THE UNIVERSITY OF MONTPELLIER:

Study of microbial biodiversity in the soil of the Lunaret reserve

Soil is an extremely rich and abundant ecosystem in terms of microscopic organisms playing a major role in biogeochemical cycles. Many factors can disturb the composition of these ecosystems, with consequences on the environment and even on human and animal health. This article presents the work carried out by students of the Master's degree Microorganism-Host-Environment Interactions (IMHE) at the University of Montpellier, as part of a research-based learning approach supervised by their teachers. The soil of the Lunaret nature reserve in Montpellier, which is likely to be subjected to anthropogenic disturbances, was chosen to study its microbial diversity using a cultural approach complemented by a molecular approach. The students participated in all stages of the project, from sampling to the writing of the article, including practical manipulations and analysis of the results.

Key-words

Bacterial community, biodiversity, learning-based research, cultural approach, molecular approach

RESUMEN

APRENDIZAJE A TRAVÉS DE LA INVESTIGACIÓN EN LA UNIVERSIDAD DE MONTPELLIER:

Estudio de la biodiversidad microbiana del suelo en la reserva de Lunaret

El suelo es un ecosistema extremadamente rico y abundante en organismos microscópicos, que desempeña un papel importante en los ciclos biogeoquímicos. Muchos factores pueden alterar la composición de estos ecosistemas, con consecuencias para el medio ambiente e incluso para la salud humana y animal. Este artículo presenta el trabajo realizado por los estudiantes del Máster en Interacciones Microorganismo-Huésped-Medio Ambiente (IMHE) de la Universidad de Montpellier, en el marco de un enfoque de formación a través de la investigación supervisada por sus profesores. El suelo de la reserva natural de Lunaret, en Montpellier, probablemente sometido a perturbaciones antropogénicas, fue elegido para estudiar su diversidad microbiana mediante un enfoque cultural complementado con un enfoque molecular. Los estudiantes participaron en todas las fases del proyecto, desde la toma de muestras hasta la redacción del artículo, pasando por las manipulaciones prácticas y el análisis de los resultados.

Palabras clave

Comunidad bacteriana, biodiversidad, aprendizaje a través de la investigación, enfoque cultural, enfoque molecular

AVANT-PROPOS

L'article suivant a été rédigé par les étudiants de la promotion 2022 du parcours *Interactions Microorganismes - Hôtes - Environnements* (IMHE) du Master de la mention Biologie-Agrosciences de l'Université de Montpellier.

Le parcours IMHE est divisé en deux profils, le profil "Recherche fondamentale" et le profil "Recherche et développement". Le parcours offre aux étudiants une approche intégrative des interactions entre les bactéries, virus, archées et champignons avec leur environnement et leurs hôtes animaux ou végétaux. Ces enseignements sont plus approfondis dans le profil "Recherche fondamentale" qui a pour but de guider ses étudiants jusqu'à la thèse pour l'obtention d'un poste de cadre (chercheur, enseignant-chercheur, ingénieur) dans un laboratoire de recherche publique ou privée. Le profil « Recherche et développement », quant à lui, amène les étudiants à se spécialiser dans la valorisation des microorganismes et leur application en biotechnologies.

Le parcours IMHE favorise un apprentissage par la recherche. C'est dans ce cadre que se sont déroulés les travaux pratiques de l'Unité d'Enseignement « Écologie microbienne » qui ont servi de support pour la rédaction de cet article. Ces TP consistaient en des prélèvements de terre dans une réserve naturelle montpelliéraine afin d'y caractériser la biodiversité bactérienne résidente. Ces travaux ont été menés sur deux années consécutives par les promotions 2021 et 2022. Ils s'inscrivent dans le projet BiInformatics Learning Lab (BILL) qui prône l'interdisciplinarité au service de l'écologie microbienne et qui est financé par l'I Site Montpellier Université d'Excellence (MUSE).

INTRODUCTION

Le sol est la composante majeure des écosystèmes terrestres comme les prairies, les forêts ou encore les surfaces cultivées. Les sols seraient parmi les habitats les plus peuplés en organismes vivants. On estime ainsi notamment qu'un gramme de sol contient près d'un milliard de bactéries et jusqu'à 200 mètres d'hyphes fongiques (Wagg *et al.*, 2014). Le sol constitue un biotope complexe dans lequel de nombreuses conditions peuvent varier, avec des conséquences sur les différents organismes qui y vivent. Il s'agirait d'un des écosystèmes les plus diversifiés sur Terre (Thakur *et al.*, 2020). Une grande variété de macroorganismes y résident, comme les insectes ou encore les oligochètes, ainsi qu'une immense diversité de microorganismes tels que les nématodes, champignons et bactéries (estimée à 10^{11} - 10^{12} espèces microbiennes, Bodor *et al.*, 2020). Mais cette diversité microbienne est très probablement sous-estimée, car une grande partie des microorganismes du sol sont considérés comme non cultivables (Bodor *et al.*, 2020).

Les sols abritent une communauté fongique très abondante, notamment en association symbiotique avec le système racinaire des végétaux : on les appelle endo- ou ecto-mycorhizes suivant les espèces végétales colonisées. Parmi les bactéries les plus abondantes dans les sols, on trouve le phylum *Actinobacteria* qui comprend plusieurs genres présentant des attributs écologiques particuliers, comme par exemple *Streptomyces*, un genre de bactérie filamenteuse reconnue comme productrice d'une large diversité d'antibiotiques utilisés dans la lutte contre les compétiteurs, et pouvant être exploités en santé humaine. On trouve également dans les sols de nombreuses bactéries se développant en anaérobiose, en réalisant des métabolismes particuliers comme la sulfato-réduction ou les fermentations, et/ou capables de former des spores, c'est-à-dire des structures dormantes très résistantes.

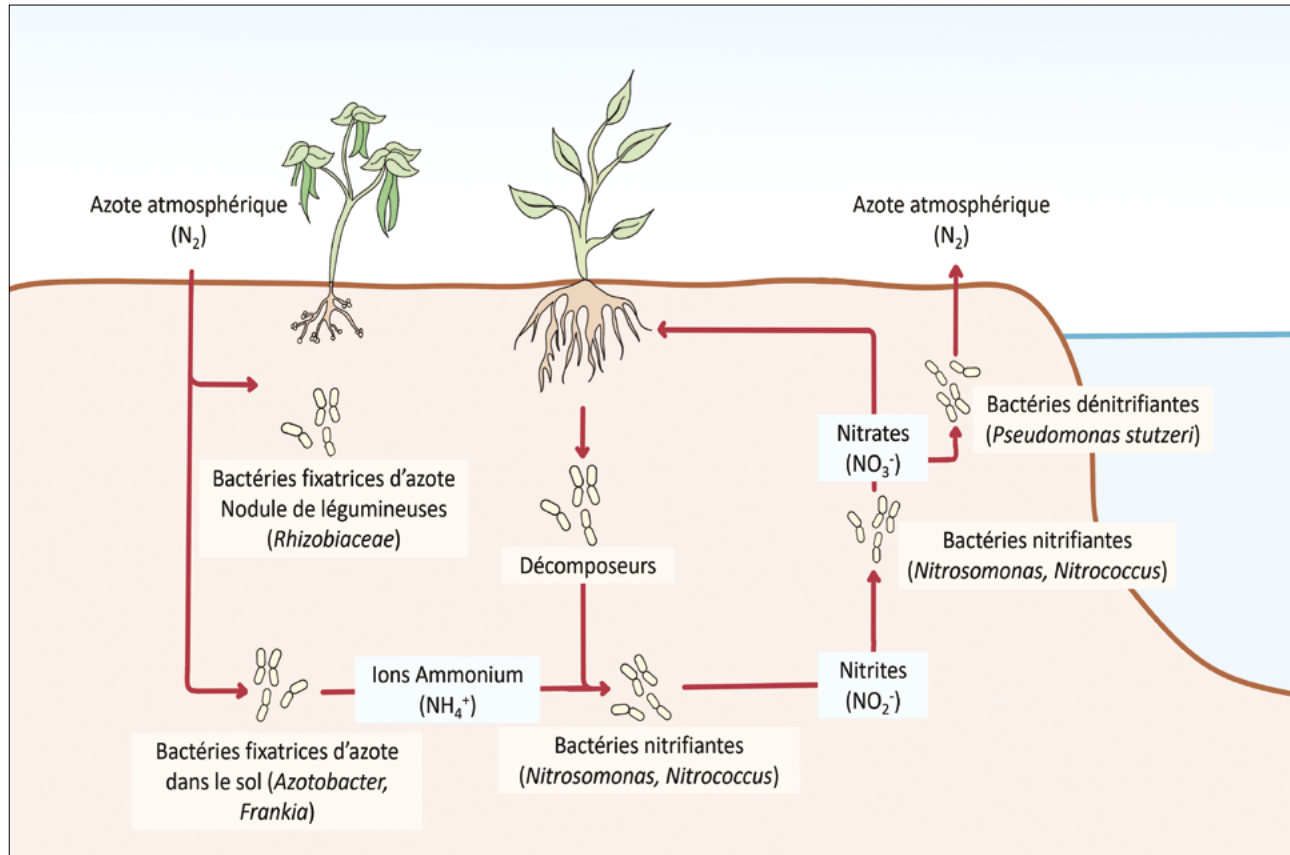
Les microorganismes occupent une place importante dans l'écosystème du sol. Ils interviennent notamment dans les cycles biogéochimiques comme le cycle de l'azote (Figure 1). Des bactéries libres comme la gamma-proteobactérie *Azotobacter* ou l'actinobactérie *Frankia* sont capables de fixer l'azote atmosphérique N_2 pour l'incorporer dans leurs acides aminés ; on les appelle diazotrophes. Certains microorganismes diazotrophes (*Rhizobiaceae*) sont également capables de développer une relation symbiotique et mutualiste directe avec les Fabacées afin de leur fournir une source d'azote au sein de protubérances racinaires appelées nodules (Goyal *et al.*, 2021). Les bactéries nitrifiantes (*Nitrosomonas*, *Nitrococcus*) convertissent les ions ammonium NH_4^+ provenant de la décomposition de la matière organique en nitrates NO_3^- , absorbés par les plantes (Figure 1) ou convertis en gaz N_2O puis N_2 par les bactéries dénitrifiantes comme la gamma-proteobactérie *Pseudomonas stutzeri* (Cellier *et al.*, 2013).

Hormis l'apport d'azote, de nombreuses gamma-proteobactéries comme *Pseudomonas putida* ou *Burkholderia gladii* sont définies comme étant des Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) permettant d'influencer positivement la croissance des plantes de manière directe (conversion de molécules précurseurs en hormones de croissance) ou indirecte (disponibilité de minéraux essentiels, réduction du stress). Elles sont donc particulièrement utiles pour l'amélioration de la croissance et le rendement des plantes lors de stress abiotiques comme la mauvaise biodisponibilité des éléments nutritifs, la sécheresse, l'excès de rayons ultraviolets. De plus, les PGPR peuvent également protéger les cultures des agents phytopathogènes, de manière directe (production de molécules antimicrobiennes) ou indirectes par des phénomènes de compétition (Jiao *et al.*, 2021). Ainsi, la biodiversité microbienne du sol influe sur les plantes environnantes (Kumar et Verma, 2018).

La diversité microbienne des sols n'est pas figée dans le temps. Il a été rapporté dans certaines études qu'elle est notamment impactée par les changements de saisons ou les

Figure 1 : Cycle biogéochimique simplifié de l'azote dans le sol. L'azote atmosphérique est fixé et converti en ammonium par les bactéries diazotrophes du sol. Les bactéries nitrifiantes convertissent l'ammonium en nitrites et/ou en nitrates qui sont une source azotée assimilable par les plantes.

Figure 1: Simplified biogeochemical nitrogen cycle in the soil. Atmospheric nitrogen is fixed and converted to ammonium by diazotrophic soil bacteria. Nitrifying bacteria convert ammonium into nitrite and/or nitrate, which are a plant-available nitrogen source.



conditions climatiques. Par exemple, en Chine, dans des vergers, la quantité de microorganismes présents dans le sol est plus élevée en été qu'en automne et au printemps, dû notamment à une chaleur et une humidité plus importantes (Luo *et al.*, 2019). Une autre étude menée dans les forêts tempérées du Japon a montré que la diversité en champignons et bactéries est plus élevée en avril et moins élevée en octobre (Shigyo *et al.*, 2019). Ces variations de diversité et d'abondance des microorganismes du sol peuvent être expliquées entre autres par des variations de température et de pH, de quantité de nutriments et de matière organique, par l'évolution du couvert végétal (Aksoy *et al.*, 2017; Siles et Margesin, 2017). Notamment, une diversité plus importante des communautés microbiennes telluriques de forêts en automne a pu être mise en relation avec une quantité accrue de nutriments et de matière organique due à la chute des feuilles des arbres (Siles et Margesin, 2017). Au vu de la grande diversité de sols et des facteurs physico-chimiques pouvant varier, il reste toutefois souvent difficile d'établir clairement un

lien entre ces paramètres et la diversité et l'abondance de son biotope (Aksoy *et al.*, 2017).

D'autres facteurs peuvent impacter la biodiversité microbienne du sol, notamment certaines pratiques agricoles comme la viticulture, via l'introduction de pesticides, de métaux lourds, ou de nouvelles espèces dans le biotope (Tang *et al.*, 2019; Jacobsen et Hjelmsø, 2014; Aksoy *et al.*, 2017). La déforestation, l'érosion, ou encore la salinisation des sols peuvent également induire des changements dans la biodiversité du sol (Tibbett *et al.*, 2020). Par exemple, une étude menée en Chine démontre que l'érosion des sols peut entraîner un appauvrissement de la biodiversité (Qiu *et al.*, 2021). Une perte de diversité peut impacter des fonctions écologiques importantes, pouvant notamment influencer sur la croissance des plantes et avoir des répercussions sur la production agricole et par conséquent sur la sécurité alimentaire (Wall *et al.*, 2015). L'étude de la diversité microbienne du sol s'inscrit dans le concept "One Health" ou "Santé Globale", qui propose une approche transdisciplinaire

considérant que la santé humaine est intimement liée à la santé animale et environnementale (Destoumieux-Garzon *et al.*, 2018).

Une étude régulière du microbiote du sol nous offre un indicateur de qualité et de santé du sol. En effet, un suivi régulier des communautés microbiennes du sol permet de remarquer de façon précoce de potentielles modifications, pouvant être révélatrices de variations de paramètres abiotiques environnants. Le suivi du microbiote peut offrir la possibilité de corriger d'éventuelles modifications de l'environnement, et ainsi assurer sa préservation (Tang *et al.*, 2019).

Afin d'analyser la biodiversité microbienne, deux approches complémentaires, l'approche culture-dépendante et l'approche culture-indépendante, peuvent être menées.

L'approche culture-dépendante est basée sur la mise en suspension d'échantillons de sol puis l'étalement sur différents milieux de culture. Ceux-ci peuvent être spécifiques à certains taxons, tandis que d'autres permettent de mettre en évidence des caractéristiques métaboliques de certaines bactéries. Cette approche permet de démontrer la présence de microorganismes ciblés et de les dénombrer. Malgré la spécificité de certains milieux, l'identification ne peut pas toujours être réalisée au niveau de l'espèce. De plus, une fraction majeure des microorganismes n'est pas cultivable en laboratoire (Bodor *et al.*, 2020). Cette approche n'offre donc qu'un aperçu restreint de la biodiversité microbienne présente dans un échantillon.

L'approche culture-indépendante repose sur des techniques moléculaires dont le metabarcoding, qui consiste en un séquençage haut débit d'un gène préalablement amplifié par PCR (*polymerase chain reaction*). Un gène conservé et des amorces universelles sont généralement choisis pour identifier le maximum de microorganismes. Les séquences ainsi obtenues sont ensuite comparées à celles des bases de données internationales. Pour l'analyse des communautés bactériennes, le gène codant l'ARN de la petite sous-unité ribosomique (ARNr 16S), présent chez tous les procaryotes, est souvent utilisé. Il présente des régions très conservées qui encadrent des régions plus polymorphes. Cette approche de metabarcoding présente des biais : en fonction des types de sol, l'extraction de la totalité de l'ADN d'un échantillon est parfois difficile ; les amorces universelles ne sont pas optimisées pour tous les microorganismes (Orgiazzi *et al.*, 2015). De plus, le metabarcoding ne permet pas systématiquement des identifications fines allant au niveau de l'espèce étant donné l'amplification très partielle du gène, les résultats sont donc exprimés en OTU (Operational Taxonomic Unit, Unité Taxonomique Opérationnelle), et peuvent se situer au rang taxonomique de la famille ou du genre.

Le but de cette étude est d'analyser le microbiote tellurique d'une zone de la réserve du Lunaret en utilisant différents indicateurs microbiens de la qualité du sol, dans une approche d'apprentissage des techniques de microbiologie et de biologie moléculaire par les étudiants du master IMHE de l'Université

de Montpellier. La réserve du Lunaret, située en bordure de rivière, est un espace vert de l'agglomération montpelliéraine de 20 hectares, classé réserve naturelle volontaire depuis le 9 octobre 2000 (<https://zoo.montpellier.fr/la-reserve-naturelle>, <https://inpn.mnhn.fr/site/natura2000/FR9101392/>). Cette réserve, accolée au parc zoologique est bordée à l'Est par le Lez, un fleuve côtier long de 30 km prenant sa source au nord de la commune de Saint-Clément-de-Rivière (Hérault). Ce fleuve est classé Natura 2000 depuis le 28 février 2001. Ce site comprend une partie du fleuve et ses bordures, dont la réserve du Lunaret (<http://www.syble.fr/>). Cette proximité du Lez pourrait impacter la biodiversité microbienne du sol de la réserve. En effet, des événements météorologiques violents et réguliers, tels que les épisodes cévenols, fréquents en Occitanie à la fin de l'été et en automne, entraînent des pluies diluviennes ainsi que des crues importantes. L'écoulement de l'eau de pluie sur la terre impacte les bactéries suite au lessivage des sols, entraînés dans l'eau des fleuves (Hermans *et al.*, 2020). De même, les crues du fleuve peuvent avoir des effets sur la flore microbienne environnante et favoriser la colonisation des sols en bordures par des espèces microbiennes apportées par les eaux (Uchida *et al.*, 2014 ; Furtak *et al.*, 2020). L'ensemble de ces perturbations peuvent modifier la diversité microbienne du sol (Faure *et al.*, 2015 ; Reese *et al.*, 2016 ; McCall *et al.*, 2020).

Pour tester cette hypothèse, des analyses quantitatives et qualitatives des communautés bactériennes ont été réalisées à partir d'échantillons de sol prélevés sur la réserve.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Échantillonnage

Trois échantillonnages ont été réalisés : septembre et novembre 2019, octobre 2020 (8 échantillons/date d'échantillonnage) dans la réserve naturelle du Lunaret (*Figure 2*) sur le bord du Lez (Coordonnées GPS : 43.643239, 3.889901). Cette zone de bordure de fleuve est constituée d'un fluvisol alluvial calcaire, de structure fine et sableuse (<https://www.geoportail.gouv.fr/donnees/carte-des-sols>, <https://www.openig.org/>) situé en ripisylve. Il s'agit d'un espace sylvicole de forêts-galleries (aulnes et frênes) avec sous-bois hygrophile (Document d'objectifs site d'importance communautaire "Le Lez" - FR 9101392, charte Natura 2000). Aux trois dates d'échantillonnage, le couvert végétal était dense (peu de feuilles mortes à terre). Les données de température, de pluviométrie (précipitations mensuelles), et de débit du Lez à la station Lavalette-Montferrier sur Lez (situé juste en amont du site d'échantillonnage) étaient : septembre 2019 : 22 °C, 60 mm, 220 L/s ; novembre 2019 : 13 °C, 81 mm, 1 140 L/s ; octobre 2020 : 16 °C, 34 mm, 578 L/s (<https://www.historique-meteo.net/france/languedoc-roussillon/montpellier/>, <https://www.hydro.eaufrance.fr/>). La terre a été

prélevée sur une profondeur maximale de 5 cm (horizon O), dans la zone d'échantillonnage définie par le cercle rouge sur la *figure 2*, à l'aide d'une spatule préalablement désinfectée à l'éthanol 70 %. Les échantillons de terre ont été conservés en tube stérile à 4 °C jusqu'à leur analyse.

Analyses des communautés microbiennes par approche culturale

La flore aérobie mésophile cultivable totale a d'abord été quantifiée par des étalements sur milieux Tryptone Caséine Soja (TCS) (*Tableau 1*). Pour chaque échantillon, un gramme de terre a été suspendu dans 9 mL d'eau distillée stérile (suspension-mère). Une dilution en cascade au dixième a été effectuée.

Cent microlitres de chacune de ces dilutions ont ensuite été étalés sur milieu TCS. Après incubation des milieux à 20 °C, les microorganismes ont été dénombrés.

Une analyse qualitative permettant la détection de microorganismes précis a également été réalisée après enrichissement en milieu liquide TCS. En utilisant des milieux de culture spécifiques de certains groupes bactériens (milieux gélosés Sabouraud et Actinobactéries, bouillon "Azotobacter" et tube gélosé "Desulfovibrio") (*Tableau 1*). La durée d'incubation pour l'ensemble des milieux est de 8 jours. La température d'incubation dépend des microorganismes recherchés.

Figure 2 : La réserve naturelle du Lunaret. A) Localisation de la zone d'échantillonnage (cercle rouge) sur la carte de Montpellier (Google Maps). B) Photographie de la zone d'échantillonnage en octobre 2020.

Figure 2: Lunaret Nature Reserve. A) Location of the sampling area (red circle) on the map of Montpellier (Google Maps). B) Photography of the sampling area in October 2020.



Tableau 1 : Récapitulatif des milieux de culture utilisés pour la mise en évidence des différents microorganismes.

Table 1: Summary of the culture media used for the detection of the different microorganisms.

Milieux / Bouillons	Analyses quantitative et/ou qualitative			Analyse qualitative	
	Gélose Tryptone Caséine Soja	Gélose Sabouraud	Gélose Actinobactéries	Milieu liquide "Azotobacter"	Tube gélosé "Desulfovibrio"
Particularités du milieu	Nutritif non sélectif	Chloramphénicol* + pH acide (5,6)	Propionate de sodium (fongicide)	Ne contient pas d'azote	Sel de Mohr (contient du sulfate)
Microorganismes cultivés	Bactéries peu exigeantes	Moisissures et levures	Actinobactéries	Bactéries fixatrices d'azote atmosphérique	Bactéries sulfato-réductrices
Observations macroscopiques	Multiple : reflet de la flore microbienne	Bords irréguliers, colonies jaunes et noires	Colonies grises et brunes	Présence trouble	Précipité noir
Températures d'incubation	20 °C	30 °C	30 °C	20 °C	20 °C

*Antibiotique inhibant la croissance de certaines bactéries

Analyses des communautés microbiennes par approche moléculaire

Deux échantillons de terre, prélevés en octobre 2020, et présentant des aspects visuels différents, ont été plus particulièrement analysés par l'approche moléculaire. Un échantillon a été prélevé sur la berge du Lez et le second au pied du sporophore d'un champignon macroscopique. Cent microlitres de la suspension de terre précédente diluée au dixième ont servi à inoculer 5 mL de bouillon d'enrichissement TCS, ensuite incubé 8 jours à 20 °C. Une extraction d'ADN a ensuite été réalisée à partir de 0,25 g de sol brut et/ou à partir de 200 µL du bouillon d'enrichissement TCS en utilisant le kit DNeasy® PowerSoil® (Qiagen) en suivant les recommandations du fabricant.

La quantité et la pureté de l'ADN ont été évaluées par dosage au Nanodrop (ThermoFischer). Une amplification par PCR de la région V3/V4 du gène codant l'ARNr 16S (gène spécifique des procaryotes, bactéries et archées) a ensuite été réalisée avec 25 µL de mélange réactionnel composé de 19 µL d'eau moléculaire à 0,26 nmol/µL de dNTP ; 2,6 nmol/µL de MgCl₂ ; 0,06 U/µL de Taq polymérase et complété avec 2,5 µL de tampon pour la Taq Polymérase 10X, 0,5 µL des amorces Forward (*Tableau 2*), 0,5 µL des amorces Reverse (*Tableau 2*) et 2,5 µL de solution d'ADN extrait. L'amplification débute avec 2 minutes de dénaturation à 95 °C, suivie de 30 cycles de 30 secondes de dénaturation à 95 °C ; de 40 secondes d'hybridation à 46,5 °C ; de 30 secondes d'élongation à 72 °C, et finit avec une étape de 10 minutes d'élongation à 72 °C (Francioli *et al.*, 2021).

Analyse bioinformatique

Le séquençage haut débit a été réalisé à la plateforme GenSeq de l'Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier (Université de Montpellier) sur l'appareil MiSeq (Illumina). Une analyse bioinformatique automatique d'amplicon 16S bactérien a été réalisée avec les logiciels fournis avec le

séquenceur (basée sur le pipeline RDP et la base de séquences GreenGenes ou UNITE) et a permis une évaluation de la qualité de l'expérimentation et une identification des groupes taxonomiques présents dans les échantillons, sous forme d'OTUs (Operational Taxonomic Units).

Analyses statistiques

Le nombre d'échantillons étant peu élevé, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été choisi, afin de comparer le nombre d'UFC (Unité Formant Colonie) médian calculé après étalement des différentes dilutions obtenues pour chaque échantillon. Le test de Kruskal-Wallis a été réalisé à l'aide du logiciel R.

RÉSULTATS

Evolution de la densité bactérienne dans le sol entre 2019 et 2020

Le milieu TCS, qui est un milieu riche en nutriments et non sélectif, permet le développement d'une grande diversité de microorganismes cultivables. Le milieu TCS est donc adapté pour évaluer la concentration bactérienne cultivable dans chaque échantillon.

La concentration bactérienne du sol est la plus élevée en septembre 2019 avec une concentration moyenne de 1,2.10⁸ UFC/g (Unité Formant Colonie/g de terre) et est la moins élevée en novembre 2019 avec une concentration moyenne de 6,1.10⁷ UFC/g (*Figure 3*). Le test statistique (Kruskal-Wallis) ne montre aucune différence significative d'abondance bactérienne en fonction de la date d'échantillonnage (P = 0,4938).

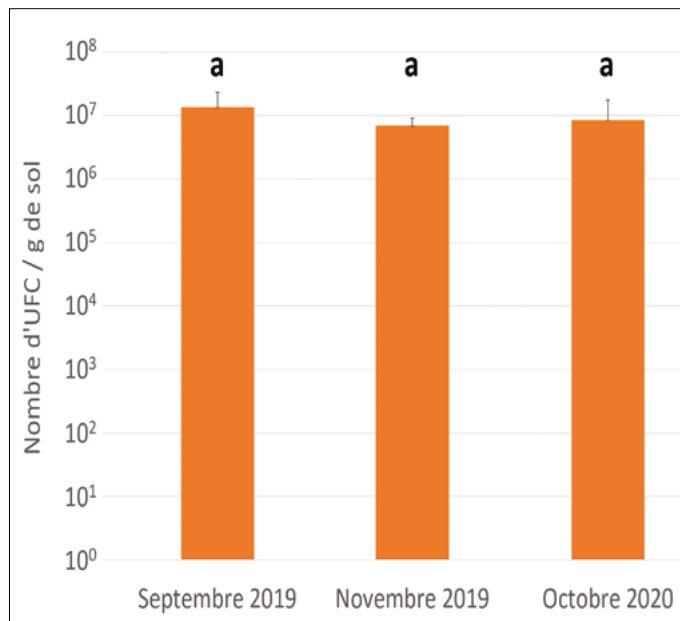
Tableau 2 : Amorces utilisées pour l'amplification de la région V3/V4 du gène codant l'ARNr 16S.

Table 2: Primers used for the amplification of the V3/V4 region of the 16S rRNA gene.

Oligonucléotide	Séquence (5'-3')
341F 1N	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGGTATAAGAGACAG N CCTACGGGNGGCWGCAG
341F 2N	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGGTATAAGAGACAG NN CCTACGGGNGGCWGCAG
341F 3N	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGGTATAAGAGACAG NNN CCTACGGGNGGCWGCAG
785R 1N	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG N GACTACHVGGGTATCTAATCC
785R 2N	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG NN GACTACHVGGGTATCTAATCC
78R5 3N	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG NNN GACTACHVGGGTATCTAATCC

Figure 3 : Densité des communautés bactériennes cultivables pour les différents échantillonnages. À partir des échantillons de sol brut, la flore cultivable a été énumérée sur milieu Tryptone Caséine Soja (TCS). Les données représentent la moyenne des densités bactériennes et l'écart-type de 4 échantillons indépendants pour septembre 2019, et 5 pour novembre 2019 et octobre 2020 ($P > 0,05$ non significatif, Test Kruskal-Wallis).

Figure 3: Culturable bacterial density for the different samplings. From the raw soil samples, the cultivable flora was determined on Tryptone Casein Soy (TCS) medium. The data represent the mean of the bacterial density and standard deviation of 4 independent samples from September 2019, and 5 from November 2019 and October 2020 ($P > 0.05$ not significant, Kruskal-Wallis test).



Diversité microbienne

Approche culturale

La diversité microbienne dans les échantillons de sol est d'abord observée macroscopiquement grâce à des étalements sur milieux de culture. Ainsi, on observe sur milieu TCS des colonies avec des caractéristiques morphologiques variées, ce qui reflète la diversité de la flore aérobie totale cultivable (Figure 4A).

Les milieux sélectifs permettent d'orienter l'identification de ces colonies à certains taxons. Le milieu Sabouraud favorisant la culture des mycètes a permis de détecter ces microorganismes dans chaque échantillon (Figure 4B). Il en est de même pour le milieu "Actinobactéries" qui permet la culture préférentielle de bactéries filamenteuses du sol affiliées au phylum *Actinobacteria*.

Des milieux peuvent aussi mettre en évidence la présence de microorganismes présentant des métabolismes particuliers. En effet, la présence de bactéries fixatrices d'azote atmosphérique (diazotrophes) et de bactéries sulfato-réductrices a été révélée respectivement grâce au bouillon "Azotobacter" et au milieu "Desulfovibrio" (Figure 4C).

Approche moléculaire

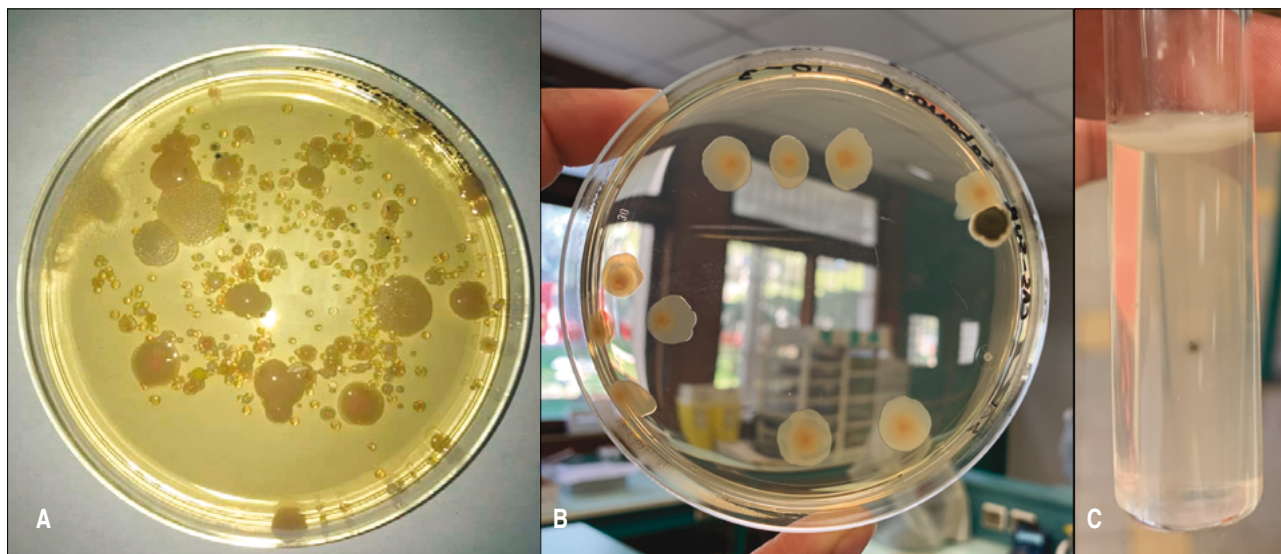
Deux échantillons de terre ont été plus particulièrement analysés par l'approche moléculaire. Les résultats préliminaires de l'analyse des séquences obtenues sont présentés dans la figure 5 (ADN extrait d'enrichissements en milieu liquide) et la figure 6 (ADN extrait de terre brute).

Pour l'ADN extrait après enrichissement en milieu liquide, la majorité des séquences obtenues ont pu être affiliées, c'est-à-dire associées à des séquences d'organismes représentées dans les bases de données internationales. Parmi les OTUs, on observe une forte prédominance de gamma-protéobactéries de la famille *Pseudomonadaceae* et de la famille *Enterobacteriaceae*, (Figure 5). Les deux échantillons analysés présentent une diversité taxonomique similaire, avec des familles bactériennes affiliées essentiellement aux gamma-protéobactéries (*Shewanellaceae*, *Aeromonadaceae*), mais aussi des bactéries anaérobies (*Clostridiaceae*, *Paenibacillaceae*) typiquement retrouvées dans les sols et capables de produire des endospores, des formes dormantes extrêmement résistantes.

Concernant l'analyse de la diversité bactérienne des échantillons de terre brute, une forte proportion de séquences n'a pas pu être affiliée au rang taxonomique de la famille (Figure 6). Les OTUs sont beaucoup plus diverses que celles retrouvées après enrichissement en milieu liquide, et les communautés microbiennes des deux échantillons analysés ne sont pas similaires. L'échantillon prélevé proche de la berge révèle essentiellement des familles bactériennes affiliées aux alpha- (*Rhodospirillaceae*), beta- (*Rhodocyclaceae*), delta- (*Polyangiaceae*) ou gamma-protéobactéries (*Sinobacteraceae*, *Chromaciaceae*). L'échantillon prélevé au pied d'un champignon macroscopique révèle quant à lui, non seulement la présence d'alpha-protéobactéries (*Rhodospirillaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Hyphomicrobiaceae*), mais également de bactéries filamenteuses typiques du sol du phylum des actinobactéries (*Nocardiaceae*, *Pseudonocardiaceae*). Seules les familles *Flexibacteraceae* et *Rhodospirillaceae* se retrouvent en proportions similaires dans les deux échantillons.

Figure 4 : Observation de colonies bactériennes sur milieux gélosés. A) Photographie de colonies sur milieu Tryptone Caséine Soja (TCS), à partir de l'étalement d'une suspension de sol diluée au millième d'un échantillon. B) Photographie de mycètes sur milieu Sabouraud, étalement d'une suspension diluée au millième d'un échantillon. C) Photographie de colonies sulfato-réductrices, le précipité noir indique la présence d'une réduction du sulfate, ensemencement à partir d'une suspension diluée au dixième d'un échantillon.

Figure 4: Observation of colonies on agar media. A) Photograph of bacterial colonies on Tryptone Casein Soy (TCS) medium, spread from a soil suspension diluted to one thousandth of a sample. B) Photograph of fungi on Sabouraud medium, spread from a suspension diluted to one thousandth of a sample. C) Photograph of sulphate-reducing colonies, the black precipitate indicates the presence of sulphate reduction, plating from a suspension diluted to one tenth of a sample.



DISCUSSION

Le projet BILL, financé par l'I-Site Montpellier Université d'Excellence, a pour objectif de former les étudiants à une démarche scientifique *via* un apprentissage par la recherche. Il a permis la mise en place de plusieurs projets, dont notamment l'étude de l'évolution du génome d'un herpesvirus pathogène de poisson, travaux valorisés par une publication scientifique (Klafack *et al.*, 2019) ; et la publication d'un article grand public sur le saut d'espèce hôte pour les virus (Avarre et Gosselin-Grenet, 2020). C'est dans ce cadre qu'a été menée pendant deux ans, lors de travaux pratiques, de sorties terrain, et de séances de travaux dirigés pour le travail rédactionnel par les étudiants accompagnés de leurs enseignantes, l'étude sur la biodiversité microbienne du sol de la réserve du Lunaret. Les étudiants ont ainsi participé, de l'échantillonnage sur le terrain et de la manipulation en salle de TP, jusqu'à l'exploitation des résultats et leur valorisation par le biais de la rédaction de cet article. Deux approches complémentaires ont permis d'étudier la biodiversité microbienne d'une zone du sol du Lunaret : l'approche culture-dépendante et l'approche moléculaire par metabarcoding du gène codant l'ARNr 16S.

Les étalements sur milieu TCS apportent une évaluation de la concentration en bactéries cultivables présentes dans le sol

du Lunaret (Figure 3). Les tests statistiques indiquent que les variations de densité bactérienne observées entre les différentes dates d'échantillonnage ne sont pas significatives. Néanmoins, ces résultats auraient pu être confirmés en multipliant les points d'échantillonnage et en réalisant plus de réplicats. Pour tous les échantillons, des microorganismes filamenteux (actinobactéries et mycètes) d'aspects macroscopiques ont été détectés. L'utilisation de milieux sélectifs ne permet pas une évaluation précise de la diversité microbienne de l'échantillon, car plusieurs espèces peuvent former des colonies d'aspects morphologiques identiques (Figure 4). De plus, seuls les microorganismes cultivables peuvent être pris en compte. Afin que l'évaluation de la diversité des communautés microbiennes soit plus robuste, il est donc nécessaire de se tourner vers des approches moléculaires basées sur le séquençage haut débit du gène de l'ARNr 16S.

Deux échantillons ont pu être analysés par cette approche, à partir de terre brute ou de culture d'enrichissement en milieu TCS. Ces deux échantillons ont été prélevés la même année et l'analyse ne permet donc pas d'appréhender la dynamique de la diversité des communautés bactériennes. En revanche, elle aide à visualiser les différences importantes de diversité bactérienne entre des sols aux caractéristiques différentes en

Figure 5 : Diagrammes représentant le pourcentage d'OTUs au rang taxonomique de la famille, obtenues à partir de l'ADN extrait des enrichissements en bouillon TCS. (A) terre prélevée sur le bord de la berge. (B) terre prélevée au pied d'un champignon macroscopique.

Figure 5: Diagrams showing the percentage of OTUs among DNA extracted from enrichment cultures in TCS. (A) soil collected from the bank edge. (B) soil collected near macroscopic fungus.

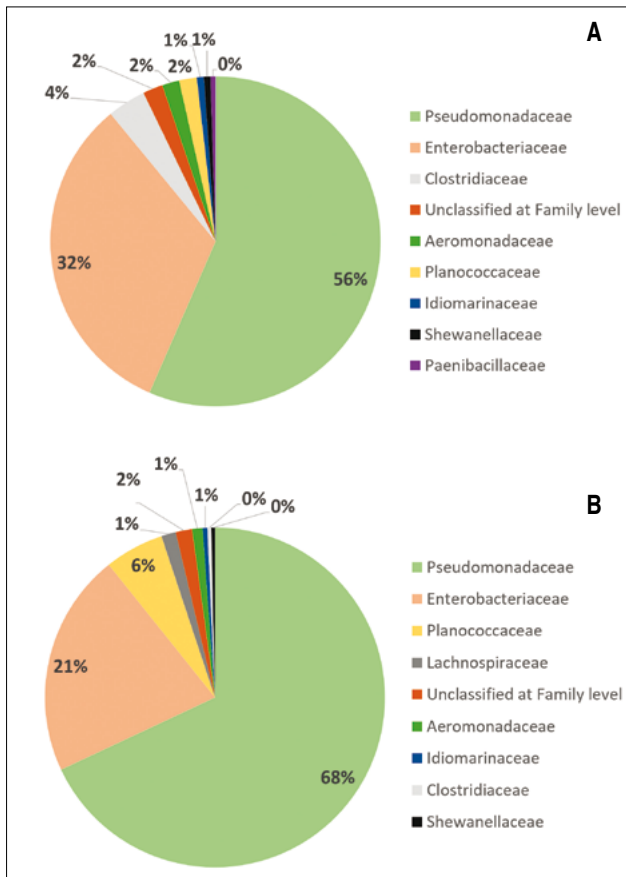
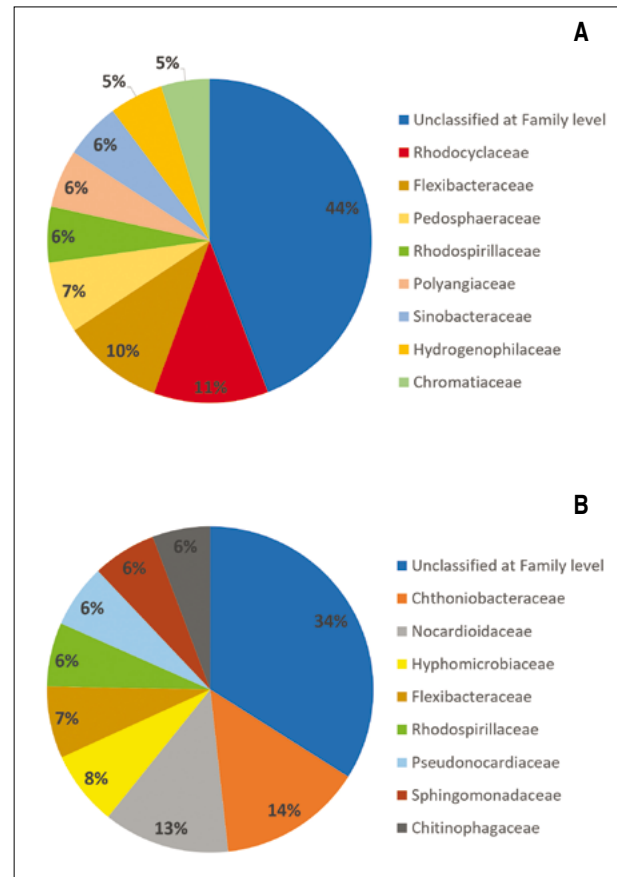


Figure 6 : Diagrammes représentant le pourcentage d'OTUs au rang taxonomique de la famille, obtenues à partir de l'ADN extrait de terre brute. (A) terre prélevée sur le bord de la berge. (B) terre prélevée au pied d'un champignon macroscopique.

Figure 6: Diagrams showing the percentage of OTUs among DNA extracted directly from soil. (A) soil collected from the bank edge. (B) soil collected near fungus.



termes de couvert végétal, de propriétés physicochimiques, d'exposition à des modifications environnementales... La diversité microbienne s'est révélée très différente entre les deux échantillons de sol brut (Figure 6). Seulement deux familles sont communes, la famille des *Flexibacteraceae* et celle des *Rhodospirillaceae*. Tandis que l'échantillon provenant de la berge incluait des OTUs de familles bactériennes ubiquitaires appartenant à plusieurs classes de protéobactéries, le deuxième échantillon (prélevé au pied d'un champignon macroscopique) révèle quant à lui, en plus de ces familles ubiquitaires, d'autres taxons typiques du sol tels des bactéries filamenteuses du phylum des actinobactéries. Il est possible que la proximité de la berge du premier échantillon ait pu influencer sur la communauté

bactérienne suite à des lessivages de ces sols ayant défavorisé le développement des actinobactéries. Effectivement, la pluviométrie avait été importante dans les quelques jours précédant l'échantillonnage : une crue du Lez avait eu lieu le 19 septembre 2020, quelques jours avant l'échantillonnage (débit à la station Lavalette-Montferrier de 21 300 L/s contre 578 L/s à la date d'échantillonnage, <https://www.hydro.eaufrance.fr/>). Cela pourrait être également dû aux différents paramètres physico-chimiques des deux terres échantillonnées pouvant influencer les communautés bactériennes d'un sol (Hermans *et al.*, 2020), ou au voisinage avec un champignon (de Boer *et al.*, 2005).

Après enrichissement en milieu TCS, la diversité microbienne des deux échantillons semble très similaire

(Figure 5). L'analyse des séquences obtenues après enrichissement en milieu TCS a révélé une majorité d'OTUs (56-68 %) de la famille *Pseudomonadaceae*. Il s'agit d'une famille bactérienne très décrite, beaucoup de ses membres sont abondants et ubiquitaires dans l'environnement. De nombreuses espèces se trouvent être des PGPR, couramment retrouvées en association avec la rhizosphère des plantes (David *et al.*, 2018). Chez les *Pseudomonadaceae*, le genre le plus abondant est le genre *Pseudomonas*. Le genre *Azotobacter* est connu pour sa capacité à fixer l'azote atmosphérique (Jnawali *et al.*, 2015); la présence de ces bactéries diazotrophes avait d'ailleurs été mise en évidence au cours de l'approche culturale en milieu "Azotobacter". La seconde famille pour laquelle un nombre important d'OTUs (21-32 %) a été mis en évidence, est celle des *Enterobacteriaceae*, dont certains genres comme *Serratia* ou *Proteus* vivent dans les sols (Krithika et Geetha Ramani, 2013). Le séquençage a également permis la détection de bactéries anaérobies sporulantes de la famille des *Clostridiaceae* (1-4 % des OTUs), généralement abondantes dans les sols et capables de voies métaboliques de sulfato-réduction (Palmer *et al.*, 2019), par ailleurs détectées (Figure 4) dans les milieux "Desulfovibrio" par l'approche culturale (Doyle *et al.*, 2018). Les familles *Enterobacteriaceae* et *Pseudomonadaceae* contiennent un nombre important de bactéries peu exigeantes et à croissance rapide. Il est généralement admis que seuls 5 à 10 % des bactéries environnementales sont cultivables. L'enrichissement en bouillon TCS a probablement introduit un biais, favorisant la croissance de bactéries compétitives comme les membres des *Enterobacteriaceae* et *Pseudomonadaceae* au détriment d'autres familles bactériennes. Cela permettrait d'expliquer la similarité de la diversité bactérienne après enrichissement, alors que les échantillons bruts semblaient contenir des taxons assez différents. De plus, l'ADN de certains groupes bactériens est plus difficile à extraire que d'autres, et les amorces utilisées pour l'amplification PCR ne sont pas adaptées à toutes les espèces (Orgiazzi *et al.*, 2015). Certaines familles sont certainement sous-évaluées du fait de ces biais supplémentaires.

CONCLUSION

Ces travaux ont permis aux étudiants d'aborder l'étude de la diversité microbienne du sol, mais également d'illustrer la complémentarité des approches culturales et moléculaires. Cette approche a été très appréciée par l'ensemble des étudiants des deux promotions 2021 et 2022. Elle les a familiarisés avec la méthode scientifique, le contexte de recherche et les manipulations relatives à l'amplification génétique et l'analyse des séquences. Plus particulièrement, la réalisation des prélèvements dans la réserve naturelle du Lunaret leur a fait découvrir un aspect concret de la recherche en écologie microbienne, qu'ils n'avaient pas pratiqué auparavant. Le fait de

ne pas savoir quels microorganismes seraient présents dans leurs échantillons les a entraînés à développer leurs capacités de réflexion et leur autonomie au laboratoire. Ces travaux les ont également sensibilisés aux problématiques écologiques que sont les équilibres des écosystèmes et la notion de Santé Globale (One Health). Enfin, le travail de rédaction effectué a été une opportunité de leur faire découvrir l'univers de la publication scientifique, avec sa rigueur et ses conventions d'écriture. Cette approche pédagogique, globalement positive pour les étudiants comme pour les enseignantes, s'est toutefois parfois heurtée à certains écueils : difficulté d'articuler le temps consacré à cette étude avec les contraintes d'examen et de travail personnel des étudiants d'une part, de recherche et d'enseignement des enseignantes d'autre part ; thématique en pointillé tout au long du master, avec parfois des difficultés de transmission d'informations d'une promotion à l'autre ; limitation des moyens financiers, matériels, humains pour des travaux pratiques ; acquisition de données parfois incomplètes (par exemple, il aurait été intéressant ici de pouvoir disposer de paramètres physico-chimiques des sols au cours des échantillonnages). Des leviers pouvant permettre d'améliorer ces points pourraient être d'une part d'obtenir des financements permettant d'accoler ce travail avec un projet de recherche développé par un doctorant dans un laboratoire, et d'autre part de s'associer avec des étudiants d'autres formations s'intéressant à des aspects complémentaires afin d'enrichir l'étude (par exemple, des étudiants en géoscience ou chimie pourraient participer pour l'analyse des paramètres physico-chimiques des sols).

L'ensemble de ces travaux, tout en créant une interaction appréciable entre les enseignantes et les étudiants, a contribué à leur formation par la recherche en constituant un fil rouge tout au long de leurs deux années de master, à travers ce projet mené du début à la fin par les deux promotions 2021 et 2022.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier l'Université de Montpellier et MUSE qui ont financé le projet innovant BILL (Bio-Informatic Learning Lab) et ces enseignements qui ont permis la réalisation de ces travaux. Nous remercions également Anne-Sophie Gosselin, pour avoir mis en place les agencements nécessaires à la bonne réalisation de ces travaux. Merci à Christine Laroui pour avoir préparé les différents milieux de culture utilisés. Enfin, merci à la plate-forme GenSeq pour avoir séquencé nos échantillons avec le support de LabEx CeMEB, un programme de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) « Investissements d'avenir » (ANR-10-LABX-04-01).

Nous remercions la promotion 2021 du Master IMHE qui a réalisé les prélèvements en 2019 lors des premiers travaux pratiques (Margaux Alibert, Amélie Blanchot, Louis Boudes, Fauve Callert, Sébastien Delaforest-Divonne, Fabien Gourc, Jordan Quéllec, Maude Laffitte, Vincent Lasserre, Margaux

Legrain, Noun Magdy.I.Fouad, Solène Poulalion, Florian Rachenne, Jeanne Rochefort, Bruno Sanchez et Juliette Tridon). Nous remercions Maud Dupuis pour la participation à la traduction du résumé en espagnol.

BIBLIOGRAPHIE

- Aksoy E., Louwagie G., Gardi C., Gregor M., Schröder C., Löhnertz, M., 2017 - Assessing soil biodiversity potentials in Europe. *Science of The Total Environment*, 589, 236-249. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.173>
- Avarre J.-C., Gosselin-Grenet A.-S., 2020 - Le Saut d'espèce : Quand Un Virus Animal Engendre l'émergence d'une Maladie Humaine. *The Conversation*, 4 novembre 202. <http://theconversation.com/le-saut-despece-quand-un-virus-animal-engendre-lemergence-dune-maladie-humaine-136204>.
- Bodor A., Bounedjoun N., Vincze G. E., Erdeiné Kis Á., Laczi K., Bende G., Szilágyi Á., Kovács T., Perei K., Rákhely G., 2020 - Challenges of unculturable bacteria: Environmental perspectives. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 19(1), 1-22. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09522-4>.
- Cellier P., Rochette P., Hénault C., Générumont S., Laville P., Loubet B., 2013 - Les émissions gazeuses dans le cycle de l'azote à différentes échelles du territoire : Une revue. *Cahiers Agriculture CIRAD*, 22(4), 258-271. <https://doi.org/10.1684/agr.2013.0641>.
- David B.V., Chandrasehar G., Selvam P.N., 2018 - Chapter 10 - Pseudomonas fluorescens : A Plant-Growth-Promoting Rhizobacterium (PGPR) With Potential Role in Biocontrol of Pests of Crops. In R. Prasad, S. S. Gill, N. Tuteja (Éds.), *Crop Improvement Through Microbial Biotechnology* (p. 221-243) Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63987-5.00010-4>.
- de Boer W., Folman L.B., Summerbell R.C., Boddy L., 2005 - Living in a fungal world : Impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(4), 795-811. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.11.005>.
- Destoumieux-Garzón D., Mavingui P., Boetsch G., Boissier J., Darriet F., Duboz P., Fritsch C., Giraudoux P., Le Roux F., Morand S., Paillard C., Pontier D., Sueur C., Voituron Y., 2018 - The One Health Concept : 10 Years Old and a Long Road Ahead. *Frontiers in Veterinary Science*, 5 (14), 1-13. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00014>.
- Doyle C.J., O'Toole P.W., Cotter P.D., 2018 - Genomic Characterization of Sulphite Reducing Bacteria Isolated From the Dairy Production Chain. *Frontiers in Microbiology*, 9 (1507), 1-9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01507>.
- Faure D., Bonin P., Duran R., Microbial Ecology EC2CO consortium., 2015 - Environmental microbiology as a mosaic of explored ecosystems and issues. *Environmental Science and Pollution Research International*, 22(18), 13577-13598. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5164-5>.
- Francioli D., Lentendu G., Lewin S., Kolb S., 2021 - DNA Metabarcoding for the Characterization of Terrestrial Microbiota—Pitfalls and Solutions *Microorganisms*, 9, 361. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020361>.
- Furtak K., Grządziel J., Gałązka A., Niedźwiecki J., 2020 - Prevalence of unclassified bacteria in the soil bacterial community from floodplain meadows (fluvisols) under simulated flood conditions revealed by a metataxonomic approach. *Catena*, 188 (104448), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2019.104448>.
- Goyal R.K., Mattoo A.K., Schmidt M.A., 2021 - Rhizobial-Host Interactions and Symbiotic Nitrogen Fixation in Legume Crops Toward Agriculture Sustainability. *Frontiers in Microbiology*, 12, 1290. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.669404>.
- Hermans S.M., Buckley H.L., Case B.S., Lear G., 2020 - Connecting through space and time : Catchment-scale distributions of bacteria in soil, stream water and sediment. *Environmental Microbiology*, 22(3), 1000-1010.
- Jacobsen C.S., Hjelmsø M.H. Agricultural soils, pesticides and microbial diversity, 2014 - *Current Opinion Biotechnology*, 27:15-20. [doi:10.1016/j.copbio.2013.09.003](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.003).
- Jiao X., Takishita Y., Zhou G., Smith D.L., 2021 - Plant Associated Rhizobacteria for Biocontrol and Plant Growth Enhancement. *Frontiers in Plant Science*, 12, 420. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.634796>.
- Jnawali A.D., Ojha R.B., Marahatta S., 2015 - Role of Azotobacter in soil fertility and sustainability—a review. *Advances in Plants & Agriculture Research*, 2 (6) - 250-253. <https://doi.org/10.15406/apar.2015.02.00069>.
- Klafack S., Fiston-Lavier A.-S., Bergmann S., Hammoui S., Schroder L., Fuchs W., Lusiasuti A., Lee P.-Y., Heredia S., Gosselin-Grenet A.-S., Avarre J.-C., 2019) Cyprinid herpesvirus 3 Evolves In Vitro through an Assemblage of Haplotypes that Alternatively Become Dominant or Under-Represented. *Viruses*, 11 (754), 1-12. <https://doi.org/10.3390/v11080754>.
- Krithika K., Geetha Ramani D., 2013 - Screening of *Serratia marcescens* isolated from soil for secondary metabolites of therapeutic importance. *International Journal of Bioassays*, 2 (8), 1162-1165.
- Kumar A., Verma J.P., 2018 - Does plant—Microbe interaction confer stress tolerance in plants : A review? *Microbiological Research*, 207, 41-52. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.004>.
- Luo X., Wang M.K., Hu G., Weng B., 2019 - Seasonal Change in Microbial Diversity and Its Relationship with Soil Chemical Properties in an Orchard. *PLOS One*, 14(12), e0215556. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215556>.
- McCall L.-I., Callewaert C., Zhu Q., Song S.J., Bouslimani A., Minich J.J., Ernst M., Ruiz-Calderon J.F., Cavallin H., Pereira H.S., Novoselac A., Hernandez J., Rios R., Branch O.H., Blaser M.J., Paulino L.C., Dorrestein P.C., Knight R., Dominguez-Bello M.G., 2020 - Home chemical and microbial transitions across urbanization. *Nature Microbiology*, 5(1), 108-115. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0593-4>.
- Orgiazzi A., Dunbar M.B., Panagos P., De Groot G.A., Lemanceau P., 2015 - Soil biodiversity and DNA barcodes : Opportunities and challenges. *Soil Biology and Biochemistry*, 80, 244-250. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.10.014>.
- Palmer J.S., Hough R.L., West H.M., Avery L.M., 2019 - A review of the abundance, behaviour and detection of clostridial pathogens in agricultural soils. *European Journal of Soil Science*, 70(4):911-929. [doi:10.1111/ejss.12847](https://doi.org/10.1111/ejss.12847).
- Qiu L., Zhang Q., Zhu H., Reich P.B., Banerjee S., Van der Heijden M.G.A., Sadowsky M.J., Ishii S., Jia X., Shao M., Liu B., Jiao H., Li H., Wei X., 2021 - Erosion reduces soil microbial diversity, network complexity and multifunctionality. *The ISME Journal*, 15(8), 2474-2489. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00913-1>.
- Reese A.T., Savage A., Youngsteadt E., McGuire K.L., Kolling A., Watkins O., Frank S.D., Dunn R.R., 2016 - Urban stress is associated with variation in microbial species composition—But not richness—In Manhattan. *The ISME Journal*, 10(3), 751-760. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.152>.
- Shigyo N., Umeki K., Hirao T., 2019 - Seasonal Dynamics of Soil Fungal and Bacterial Communities in Cool-Temperate Montane Forests. *Frontiers in Microbiology*, 10 (1944), 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01944>.
- Siles J.A., Margesin R., 2017 - Seasonal soil microbial responses are limited to changes in functionality at two Alpine forest sites differing in altitude and vegetation. *Scientific Reports*, 7 (2204), 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02363-2>.

- Tang J., Zhang J., Ren L., Zhou Y., Gao J., Luo L., Yang Y., Peng Q., Huang H., Chen A., 2019 - Diagnosis of soil contamination using microbiological indices: A review on heavy metal pollution. *Journal of Environmental Management*, 242, 121-130. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.061>.
- Thakur M.P., Phillips H.R.P., Brose U., De Vries F.T., Lavelle P., Loreau M., Mathieu J., Mulder C., Van der Putten W.H., Rillig M.C., Wardle D.A., Bach E.M., Bartz M.L.C., Bennett J.M., Briones M.J.I., Brown G., Decaëns T., Eisenhauer N., Ferlian O., Cameron E.K., 2020 - Towards an integrative understanding of soil biodiversity. *Biological Reviews*, 95(2), 350-364. <https://doi.org/10.1111/brv.12567>.
- Tibbett M., Fraser T.D., Duddigan S., 2020 - Identifying potential threats to soil biodiversity. *PeerJ*, 8 (e9271), 1-29. <https://doi.org/10.7717/peerj.9271>.
- Uchida Y., Wang Y., Akiyama H., Nakajima Y., Hayatsu M., 2014 - Expression of denitrification genes in response to a waterlogging event in a Fluvisol and its relationship with large nitrous oxide pulses. *FEMS Microbiology Ecology*, 88 (2), 407-423. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12309>.
- Wagg C., Bender S. F., Widmer F., van der Heijden M.G.A., 2014 - Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(14), 5266-5270. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320054111>.
- Wall D.H., Nielsen U.N., Six J., 2015 - Soil biodiversity and human health. *Nature*, 528(7580), 69-76. <https://doi.org/10.1038/nature15744>.

<https://www.geoportail.gouv.fr/donnees/carte-des-sols>

<https://www.openig.org/>

<https://zoo.montpellier.fr/la-reserve-naturelle>, consulté le 27 septembre 2021

<http://www.syble.fr/>, consulté le 27 septembre 2021

<https://inpn.mnhn.fr/site/natura2000/FR9101392/>, consulté le 23 septembre 2021

