



HAL
open science

Evaluation de l'impact des pratiques agricoles sur l'abondance et la diversité des communautés microbiennes du sol

Manon Bouancheau

► **To cite this version:**

Manon Bouancheau. Evaluation de l'impact des pratiques agricoles sur l'abondance et la diversité des communautés microbiennes du sol. [Stage] France. Université de Bourgogne (UB), FRA. 2013, 16p. hal-02802524

HAL Id: hal-02802524

<https://hal.inrae.fr/hal-02802524v1>

Submitted on 5 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE DE BOURGOGNE – Faculté des Sciences Gabriel
UFR Sciences de la Terre et de l'Environnement – 6 Bd Gabriel
21000 DIJON



INRA DE DIJON
UMR Agroécologie – Plateforme Génosol
17, rue de Sully
321000 DIJON

RAPPORT DE STAGE

« Evaluation de l'impact des pratiques agricoles sur l'abondance et la diversité des communautés microbiennes du sol »



Manon BOUANCHEAU
Master 1 Sciences de l'Environnement
Année 2012-2013

Maitres de stage :
Pierre-Alain Maron & Emilie Bourgeois

REMERCIEMENTS

Je tiens avant tout à remercier Mr Lionel Ranjard, responsable scientifique de la plateforme GenoSol de l'UMR «Agroécologie», pour m'avoir accueillie au sein de l'INRA de Dijon dans le cadre de mon stage.

Je souhaite tout particulièrement remercier Mlle Emilie Bourgeois, avec qui j'ai travaillé tout au long de mon stage, pour le temps qu'elle m'a consacré, sa patiente face à une novice ainsi qu'à la confiance qu'elle a su m'accorder. Elle n'a pas hésité à me confier des responsabilités vis-à-vis des expérimentations qui rentreront dans le cadre de sa thèse.

J'adresse également mes remerciements à Mr Pierre-Alain Maron pour ses conseils lors de la rédaction du rapport.

Je remercie enfin mes collègues de bureau ainsi que tous les membres de l'équipe Genosol qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce stage.

SOMMAIRE

TABLES DES ILLUSTRATIONS

GLOSSAIRE

I. Présentation de l'organisme d'accueil

A. L'INRA

B. L'INRA de Dijon

1) L'UMR Agroécologie

2) La plateforme Génosol

II. Introduction

III. Matériels et méthodes

A. Mise en place d'une stratégie d'échantillonnage

1) Dispositif expérimental

2) Prélèvements

3) Stockage et conservation des échantillons de sols

B. Détermination de la biomasse moléculaire microbienne du sol

1) Extraction de l'ADN du sol

2) Quantification des ADN

C. Détermination des densités bactériennes et fongiques du sol

1) Purification des ADN et quantification

2) PCR quantitative

D. Analyses statistiques

IV. Résultats et discussion

A. Impact des modes d'usage sur la biomasse microbienne

1) Cinétique temporelle pour chaque traitement

2) Cinétique temporelle pour T1 et T2

B. Impact des différents modes d'usage sur les densités bactériennes et fongiques

1) Densité bactérienne

2) Densité fongique

V. Conclusion

BIBLIOGRAPHIE

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

<u>Figure 1</u> : Localisation du site d'étude.....	page 4
<u>Figure 2</u> : Schéma du dispositif expérimental.....	page 5
<u>Figure 3</u> : Stratégie d'échantillonnage.....	page 7
<u>Figure 4</u> : Tamisage.....	page 7
<u>Figure 5</u> : Quartage.....	page 7
<u>Figure 6</u> : Pilulier de 50 mL.....	page 7
<u>Figure 7</u> : Lyophilisateur.....	page 7
<u>Figure 8</u> : Organigramme de l'extraction.....	page 8
<u>Figure 9</u> : Mélangeur-broyeur FastPrep.....	page 9
<u>Figure 10</u> : Etuve.....	page 9
<u>Figure 11</u> : Dispositif électrophorétique avant dépôt.....	page 10
<u>Figure 12</u> : Schémas des étapes et composants d'une purification d'ADN.....	page 11
<u>Figure 13</u> : Principe de la PCR en temps réel.....	page 12
<u>Figure 14</u> : Photographie d'un gel d'électrophorèse après migration des ADN, sous cuve à UV.....	page 13
<u>Figure 15</u> : Evolution temporelle de la biomasse microbienne moléculaire des 5 traitements.....	page 14
<u>Figure 16</u> : Effets du travail du sol sur la biomasse microbienne moléculaire par restitution des résidus.....	page 15
<u>Figure 17</u> : Evolution temporelle de la densité bactérienne pour les 5 traitements.....	page 16
<u>Figure 18</u> : Evolution temporelle de la densité fongique pour les 5 traitements.....	page 17

Tableaux

<u>Tableau 1</u> : Succession des cultures sur la période 2010-2013.....	page 6
<u>Tableau 2</u> : Différenciation des traitements.....	page 6

GLOSSAIRE

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ADNr: Acide Désoxyribonucléique ribosomal

BET : Bromure d'ETHidium

CRG : Centre de Ressource Génétique

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique

EPST : Etablissement Public à caractère Scientifique et Technologique

H₂O UP : Eau Ultra Pure

INRA : Institut National de Recherche Agronomique

NaCl : Chlorure de sodium

ORE : Observatoire de Recherche en Environnement

PCR: Polymerase Chain Reaction

PVPP : Poly Vinyl Poly Pirrolidone

SDS : DodécylSulfate de Sodium

SIE : Système d'Information Environnementale

TBE : Tris, Acide Borique, EDTA

Tris-HCl : Trishydroxyméthylaminométhane-Acide Chlorhydrique

UMR : Unité Mixte de Recherche

I. Présentation de l'organisme d'accueil

A. L'INRA



L'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) est un Etablissement Public à caractère Scientifique et Technologique (E.P.S.T.), placé sous la double tutelle du ministère chargé de l'Agriculture, et des ministères chargés de l'Éducation nationale, de l'Enseignement supérieur et de la Recherche.

Fondé en 1946 dans le but de moderniser l'agriculture française suite à une pénurie alimentaire après la seconde guerre mondiale, il est aujourd'hui le premier institut européen de recherche agronomique. L'INRA mène des recherches au service d'enjeux de société majeurs -l'alimentation, l'agriculture et l'environnement- afin de relever les grands défis planétaires de demain dans une perspective de développement durable : assurer la nutrition humaine et la valorisation des territoires dans un contexte de changement climatique et d'épuisement des ressources fossiles. Il a donc pour ambition de développer une agriculture à la fois compétitive, respectueuse de l'environnement, des territoires et des ressources naturelles, et mieux adaptée aux besoins nutritionnels de l'homme ainsi qu'aux nouvelles utilisations des produits agricoles.

Les recherches sont conduites au sein de treize départements scientifiques ; chaque département anime un ensemble de champs disciplinaires pour explorer de nouvelles questions de recherche : 1828 chercheurs et 1784 thésards travaillent à l'institut ainsi que 2427 ingénieurs et 4249 techniciens. Aussi, il accueille chaque année 1000 chercheurs étrangers. Afin de parvenir à ses objectifs, l'INRA est présent dans 21 centres régionaux (y compris en outre-mer) répartis sur 150 sites dans toute la France. Parmi eux se trouve le centre INRA de Dijon.

B. L'INRA de Dijon

Le centre INRA-Dijon réunit le domaine expérimental d'Époisses, la station agronomique de Dijon, la station œnologique de Beaune et celle d'hydrobiologie lacustre de Thonon-les-Bains. Après une intense période de structuration autour de 4 grandes unités de recherche, le centre décline les grandes thématiques définies au niveau national avec l'agroécologie, les territoires et leurs développements, et enfin le goût et l'alimentation. Le site de emploi 700 personnes (dont la moitié de chercheurs doctorants et post-doctorants) sur 12 000m² de laboratoire, 2000m² de serre et un domaine expérimentale de 150ha.

1) L'UMR Agroécologie



Agroécologie
Dijon
Unité de Recherche

Cette nouvelle Unité Mixte de Recherche UMR), créée en janvier 2012 est placée sous la triple tutelle d'AgroSup Dijon, de l'INRA et de l'Université de Bourgogne et compte environ 250 personnes. Elle est organisée autour de 4 pôles (EcolDur, Geapsi, IPM ERL CNRS 6300 et MERS) et de 3 plateformes (ERB, GenoSol, Serres PPHD). Issue de la fusion des anciennes UMR BGA (Biologie et Gestion des Adventices), MSE (Microbiologie du Sol et de l'Environnement) et

l'UMR PME (Plantes-Microbes-Environnement), l'UMR Agroécologie répond à un grand nombre de thématiques scientifiques en réunissant les activités des anciennes UMR. Parmi elles, des écologues, biologistes, physiologistes, généticiens, agronomes et microbiologistes faisant progresser la recherche sur cette discipline émergente.

Son objectif est d'enrichir le domaine agronomique par de nouvelles connaissances des processus écologiques, et des interactions entre communautés dans l'espace agricole. Pour ceux-ci, les recherches seront réalisées à différents niveaux d'organisation (molécules, cellules, organismes, populations, communautés) ainsi qu'à différentes échelles spatiales (microcosmes, parcelles, paysages) et temporelles (cycle microbien, cycle de développement végétal, cycle de culture, rotation, modifications du paysage,...).

Les enjeux au sein de cet UMR novatrices sont considérables, comme :

- assurer une production agricole de qualité et en quantité suffisante
- réduire l'utilisation des intrants
- proposer des systèmes agricoles innovants, qui respectent et valorisent la biodiversité et l'environnement.

Dans cette perspective, des programmes de recherche ont été mis en place et sont travaillés au sein de cette UMR.

2) La plateforme Génosol



Créée en 2008 au sein de l'UMR Agroécologie-Université de Bourgogne, la plateforme Génosol est à la fois :

- Un Centre de Ressource Génétique (CRG) national sur les sols, le premier en Europe, qui a pour but de stocker et de conserver les ressources génétiques (ADN) et de les mettre à disposition de la communauté scientifique. Les échantillons de sols conservés proviennent en majorité de réseaux de surveillance des sols, d'observatoires de recherche en environnement, de sites expérimentaux pérennes et de zones ateliers. A ce jour, plus de 9000 sols sont stockés dans le CRG.
- Une plateforme technique, qui développe des outils de caractérisation des ressources génétiques microbiennes des sols (génotypage, pyroséquençage, métagénomique, métaprotéomique...) et assure une veille technologique. Elle contribue à la standardisation des procédures et des outils moléculaires avec des objectifs de normalisation.
- Un Système d'Information Environnementale (SIE) centré sur le développement de la base de données MicroSol, permettant de gérer le CRG et d'analyser des données de caractérisation génétique des sols. Cette base permettra d'élaborer un référentiel d'interprétation des analyses biologiques des sols

II. Introduction

Interfaces entre la biosphère et la lithosphère, les sols sont considérés comme des environnements complexes (Plassart *et al.*, 2012). En plus d'être un réservoir de diversité biologique, le sol est le support de la majorité des activités humaines, dont l'agriculture : aujourd'hui, 12 % des terres émergées dans le monde sont cultivées. L'agriculture a longtemps reposé sur l'hypothèse selon laquelle le sol constituait une ressource inépuisable pour une production en croissance perpétuelle. C'est improbable compte tenu de l'extrême lenteur de sa formation, il doit être considéré comme une ressource non-renouvelable, qu'il importe de préserver. Dans ce contexte, la préservation, voire la promotion des ressources biologiques apparaît indispensable étant donné son implication dans nombres des services rendus par le sol. Il engage donc de développer une nouvelle approche quant à une utilisation durable des sols afin d'assurer la pérennité de nourriture, en respectant les limites écologiques, qui assurent le maintien dans le temps de cette capacité de production.

C'est dans ce contexte qu'est lancé depuis 2010 le projet SOFIA ~Agrosystèmes et biodiversité fonctionnelle des Sols~. Il a pour objectif général de mieux comprendre l'impact des pratiques agricoles sur la biodiversité du sol (micro, méso, macro-faune) et le fonctionnement biologique associé. Ce projet réunit 8 partenaires du monde académique (Université, INRA) et un partenaire privé (AgroTransfert) sur l'horizon 2010-2014. Il s'appuie sur un site de l'Observatoire en Environnement « Agroécosystèmes, Cycles Biogéochimiques et Biodiversité », situé dans la Somme et géré par l'INRA.

Dans ce projet, l'implication de l'équipe de recherche dans laquelle j'ai effectué mon stage porte sur la caractérisation de l'impact des pratiques sur la composante microbienne du sol (bactéries et champignons), notamment dans le cadre de la thèse d'E. Bourgeois.

Avec 1 million d'espèces par gramme de sol (Bates *et al.*, 2011 ; Torsvik *et al.*, 2002), les microorganismes sont les organismes les plus diversifiés de la biosphère (Roesch *et al.*, 2007 ; Whitman *et al.*, 1998), et assurent de nombreuses transformations à la base des services rendus par le sol (Parkinson *et al.*, 1991). La composante microbienne est connue pour être impliquée dans de nombreux processus biochimiques importants, telles que la décomposition de la matière organique, l'humification, la transformation et le cycle des éléments nutritifs du sol. Les communautés microbiennes réagissent au stress environnemental ou perturbations de l'écosystème, affectant la disponibilité des composés énergétiques qui soutiennent les populations microbiennes (Marinari *et al.*, 2007). Parmi les communautés microbiennes, les bactéries forment un très bon indicateur d'impact. C'est un indicateur sensible et précoce des changements dans la gestion des sols (Ranjard *et al.*, 2006).

Dans ce contexte, mon stage a pour objectif d'évaluer l'impact des pratiques agricoles sur l'abondance et la diversité des communautés microbiennes du sol. Pour cela, il repose sur la caractérisation d'échantillons prélevés sur l'Observatoire de Recherche en Environnement (INRA Mons). Dans un premier temps, il a été question d'extraire l'ADN des sols issus d'un échantillonnage dynamique comprenant 4 années d'expérimentation, sur l'horizon 0-20 cm.

Ensuite, par des outils et techniques moléculaires de pointes, comme la PCR quantitative, il a été question de quantifier l'ADN microbien et analyser la distribution des microorganismes dans la couche superficielle du sol en fonction de 5 modes de gestion différents.

III. Matériels et méthodes

A. Mise en place d'une stratégie d'échantillonnage

Le projet s'appuie sur un site de l'Observatoire de Recherche en Environnement «ORE» qui met à disposition de la communauté scientifique des plateformes expérimentales et fait émerger des projets pluridisciplinaires. La commune d'Estrées-Mons dans la Somme accueille notre site d'expérimentation (cf. Figure 1). L'objectif de cet observatoire est d'étudier les effets à long terme sur l'environnement (sol, eau et air) des systèmes de grande culture. En effet, le site offre une série de traitements expérimentaux faisant varier la rotation culturale (rotation de cultures annuelles et culture pérenne à vocation énergétique), les intrants minéraux (N) et le travail du sol.



Figure 3: Localisation du site d'étude

1) Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental est composé de 5 traitements (T1 à T5) répétés sur 4 blocs sur une surface totale de 11 hectares (cf. Figure 2). Les prélèvements de sol ont été réalisés de 2010 (état initial de l'essai) jusqu'en 2013. Nous possédons donc au total 80 échantillons à analyser (4 blocs x 5 traitements x 4 années).

LEGENDE



Allées enherbées et entretenues

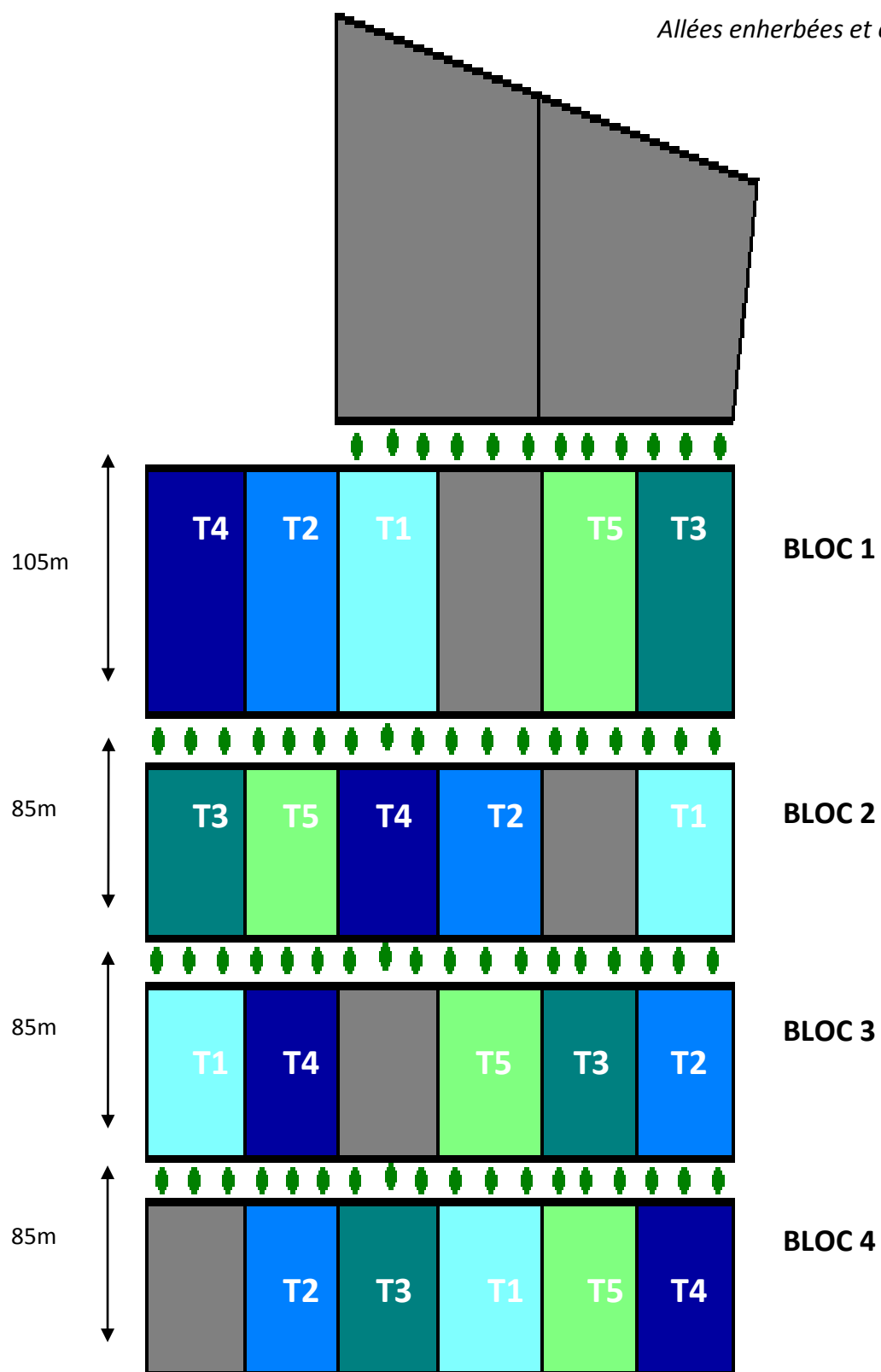


Figure 2: Schéma du dispositif expérimental

Les traitements T1 à T5 sont présentés dans le tableau ci-dessous (cf. Tableau 1).

	TRAVAIL DU SOL	MODALITES DE GESTION
T1	Labour annuel	Restitution des résidus
T2	Travail réduit du sol	Restitution des résidus
T3	Travail réduit du sol	Exportation des résidus
T4	Labour annuel	Restitution des résidus et faible apport en N
T5	Non travail	Exportation des résidus

Tableau 1: Différenciation des traitements

LE TRAVAIL DU SOL est un ensemble d'opérations périodiques, exécutées pour créer et maintenir des conditions de production de cultures optimales :

Le labour annuel/occasionnel est une technique de travail du sol sur les 20 premiers centimètres, consistant à retourner la couche arable afin de préparer le futur lit de semences en éliminant les adventices et les repousses de cultures installées et assure un enfouissement de près de 90 % des graines de l'année, localisées en surface. En profondeur, les graines ne peuvent pas germer et entrent en dormance.

Le travail réduit du sol est un travail mécanique en dessous de la zone de semis mais sur une profondeur limitée selon les conditions du milieu (entre 5 et 10 cm). Parmi elles, le déchaumage, qui consiste à enfouir les chaumes (tiges) et restes de paille afin de favoriser leur décomposition avant le labour profond.

Le traitement T5 correspondant au non travail est une monoculture de Switchgrass (*Panicum virgatum*), une graminée sauvage C₄, rhizomateuse et pérenne.

LES MODALITES DE GESTION peuvent contribuer de façons déterminantes à assurer le maintien de la fertilité des sols cultivées.

La restitution des résidus consiste à laisser les tiges des cultures lors de la récolte, qui dessècheront et mourront sur place. L'exportation des résidus est à l'inverse, la libération du sol des débris végétaux de la culture qui vient de passer.

Les différentes parcelles sont mises en culture pendant la durée du projet de façon similaire pour les parcelles T1 à T4 (cf. Tableau 2).

2010		2011		2012		2013	
Printemps /Été	Automne/ Hiver	Printemps /Été	Automne/ Hiver	Printemps /Été	Automne/ Hiver	Printemps /Été	Automne/Hiver
Pois	Blé	Blé	Colza	Colza	Colza/ Moutarde	Orge	Non légumineuse

Tableau 2: Succession des cultures sur la période 2010-2013

Les encadrés orange correspondent aux inter-cultures ; elles permettent de recouvrir le sol d'un couvert végétal après une céréale et avant une culture de printemps, assurant sa protection du vent, de la pluie et du froid durant l'hiver.

2) Prélèvements

Pour chaque échantillon, 5 prélèvements sont réalisés sur l'horizon 0-20 cm à l'aide d'une tarière (cf. Figure 3). Les cinq carottes de sol récoltées sur la même parcelle sont poolées dans le but d'être représentatif de la surface d'échantillonnage. Les positions des points de prélèvement sont géo-référencées pour qu'ils soient situés au même endroit l'année suivante.

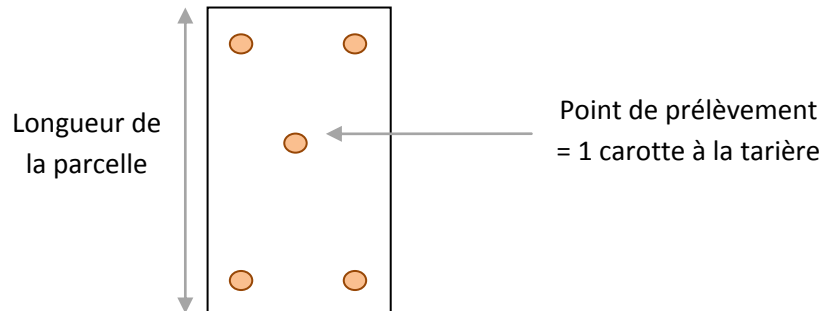


Figure 3: Stratégie d'échantillonnage

Sur le terrain, les échantillons sont stockés en sachet plastique de type sac de congélation dans une glacière à 4°C pour conserver la vie, en attendant leur acheminement au conservatoire.

3) Stockage et conservation des échantillons de sols

Une fois les échantillons arrivés au conservatoire, plusieurs étapes sont nécessaires avant leur stockage. Une étape de **tamissage** à 4 mm est effectuée pour casser les éventuels structures compactes (cf. Figure 4). Chaque échantillon de sol est ensuite **quarté** par un système de prise en diagonale, pour homogénéiser les sous-échantillons ainsi obtenus (cf. Figure 5). Pour chaque échantillon de sol, un aliquot de 50 g est placé dans un pilulier de 50 mL, **étiquetés** avec des étiquettes résistantes à -40°C et sont **lyophilisés** (cf. Figure 6 & 7). Ces aliquots serviront de stock pour de futures extractions d'ADN nécessaires à la caractérisation moléculaire des communautés microbiennes indigènes. Les piluliers sont conservés dans des congélateurs à -40°C, c'est la **cryoconservation**. Le refroidissement rapide va permettre de stabiliser les matériaux biologiques (forme, structure et composition) et empêcher toutes activités métaboliques.



Figure 4 : Tamissage



Figure 5 : Quartage



Figure 6 : Pilulier de 50 mL



Figure 7: Lyophilisateur

B. Détermination de la biomasse moléculaire microbienne du sol

Afin de procéder à la caractérisation génétique des populations bactériennes et fongiques, il convient dans un premier temps d'extraire l'ADN du sol. La procédure utilisée est la méthode d'extraction d'ADN de Ranjard *et al.* (2003).

1) Extraction de l'ADN du sol

L'extraction d'ADN du sol se décompose en plusieurs étapes (cf. Figure 8).

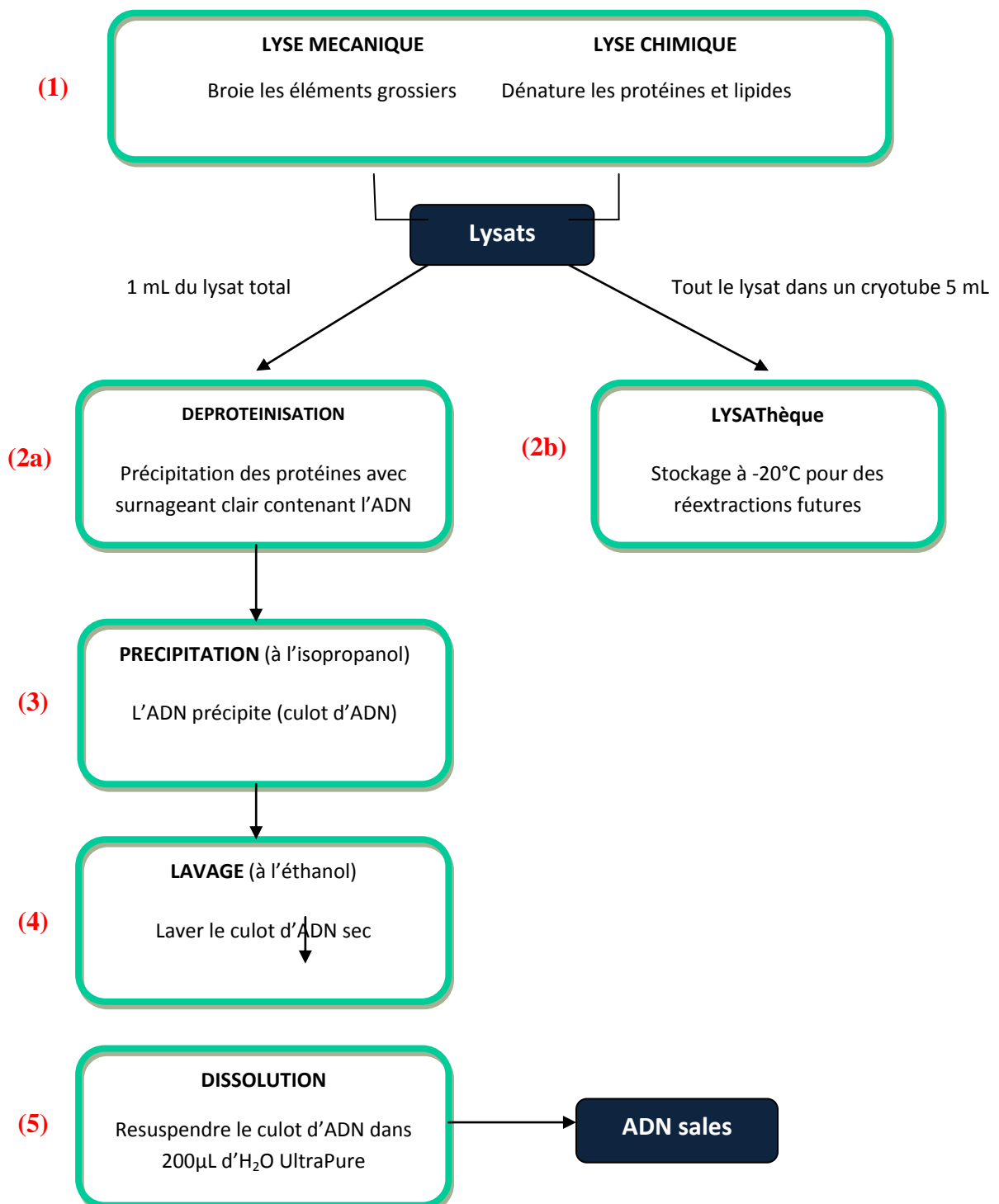


Figure 8: Organigramme d'une extraction

L'ADN est extrait à partir d'un gramme de sol sec. Pour chaque échantillon est mélangé 5 mL de tampon d'extraction (0,5 mL de Tris-HCl à 100 mM pH 8, 1 mL d'EDTA à 100 mM pH 8, 0,5 mL d'NaCl à 100 mM, 0,5 mL de SDS à 2% et 2,5 mL d'H₂O UP), 2 g de billes à Ø 0,1 mm en silice, 2,5g de billes à Ø 1,4 mm en céramique et 4 billes de verre à Ø 4 mm. Les échantillons sont ensuite placés dans un agitateur « FastPrep®-24 » (MP-Biomedicals, NY, USA), 3 fois 30 s (cf. Figure 9). Cela permet la déstructuration du sol. Les tubes sont ensuite incubés au bain-marie à 70°C pendant 30 min. Pour terminer, les échantillons sont centrifugés à 7000g pendant 5 min pour obtenir un surnageant contenant l'ADN, nommé lysat **(1)**. 1 mL du lysat obtenu est récupéré puis mit à incuber sur la glace avec 100 µL d'acétate de potassium (3 mM, pH 5,5) puis centrifugé à 14000g pendant 5 min à 4°C afin de faire précipiter les protéines **(2a)**, (le surnageant restant est placé dans un cryotube Nalgène de 5 mL et conservé à -40°C **(2b)**). L'ADN est ensuite précipité par ajout d'isopropanol à -20°C et par centrifugation à 13000 rpm pendant 30 min **(3)**. Le culot d'ADN obtenu est lavé avec 400 µL d'éthanol puis séché à l'étuve à 60°C (cf. Figure 10) **(4)**. Il est enfin remis en suspension dans 200 µL d'eau UP **(5)**.

Les ADN obtenus sont dits « sales » et sont stocker à -20°C pour une conservation à long terme. C'est à partir de cet ADN remis en suspension que l'on va pouvoir obtenir, par quantification, la biomasse moléculaire microbienne.



Figure 9: Mélangeur-broyeur FastPrep



Figure 10: Etuve

2) Quantification des ADN

La quantification des ADN sales permet la mesure de la biomasse microbienne par la concentration en ADN contenue dans chaque échantillon, estimée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% dans une solution tampon de TBE 1X, en comparaison avec une gamme étalon d'ADN de thymus de veau (cf. Figure 11).

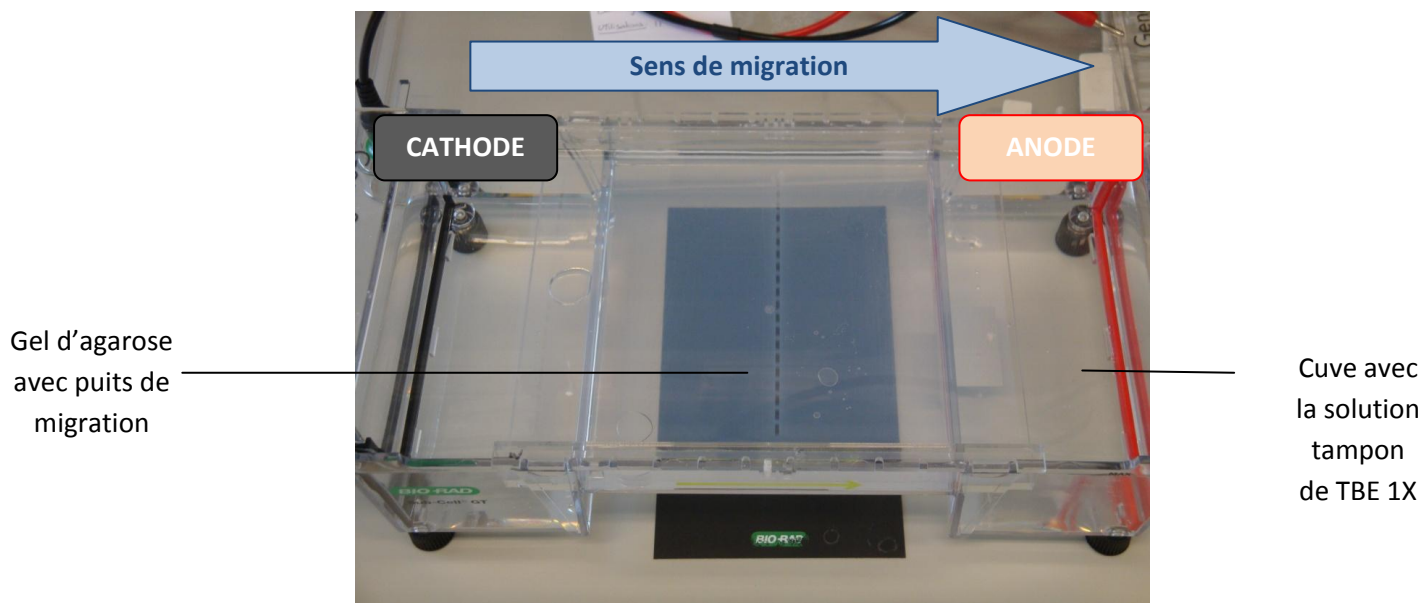


Figure 11: Dispositif électrophorétique avant dépôt

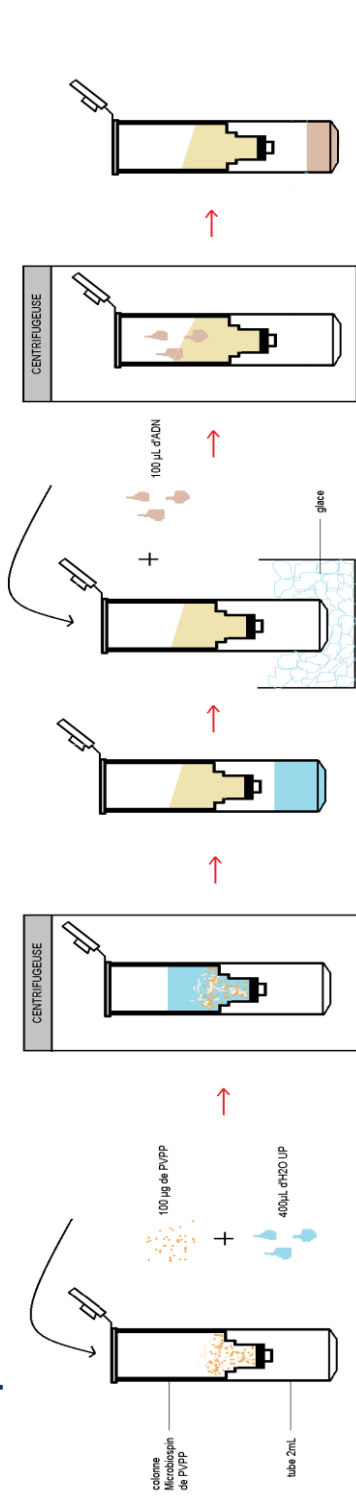
Après la migration, les ADN sont révélés dans un bain de BET puis lavés dans un bain d'eau. Ensuite, le gel est placé sous les UV et photographiés (appareil Biocapt). Les bandes d'ADN marquées au BET fluorescent et sont alors visibles. L'image du gel ainsi obtenue est analysée à l'aide du logiciel Image Quant TL version 7.0.

C. Détermination des densités bactériennes et fongiques du sol

1) Purification des ADN et quantification

L'objectif est de purifier des ADN sales de sol après leur extraction. Il s'agit d'obtenir des ADN non dégradés et suffisamment purifiés pour qu'ils ne contiennent pas d'impuretés pouvant interférer avec les réactions enzymatiques (amplifications par PCR). Elle se fait par deux méthodes successives et différentes : la première étape est un « tamis moléculaire » réalisé sur colonne Microbiospin remplie de PVPP (Poly Vinyl Poly Pirrolidone), polymère de haut poids moléculaire. La seconde étape consiste à utiliser une colonne d'exclusion d'un kit GeneClean® Turbo (MP Biomedical). Ces deux étapes sont complémentaires pour permettre d'éliminer d'éventuels éléments polluants tels que les protéines, sucres, macromolécules phénoliques, acides humiques (cf. Figure 12). La quantification des ADN purifiés s'opère de la même manière que les ADN « sales », comme expliqué dans le protocole précédemment (voir ci-dessus). C'est à partir de ces ADN purifiés que l'on va pouvoir déterminer les densités de bactéries et champignons de chaque échantillon par PCR quantitative.

1ère étape



2 min à 1000g à 10°C
Renouveler l'opération 2 fois.
Vider le tube de 2 mL et centrifuger à vide pendant 4 min.

Placer la colonne dans un tube propre.
Laisser l'ADN pénétrer pendant 5 min dans la glace.

2ème étape

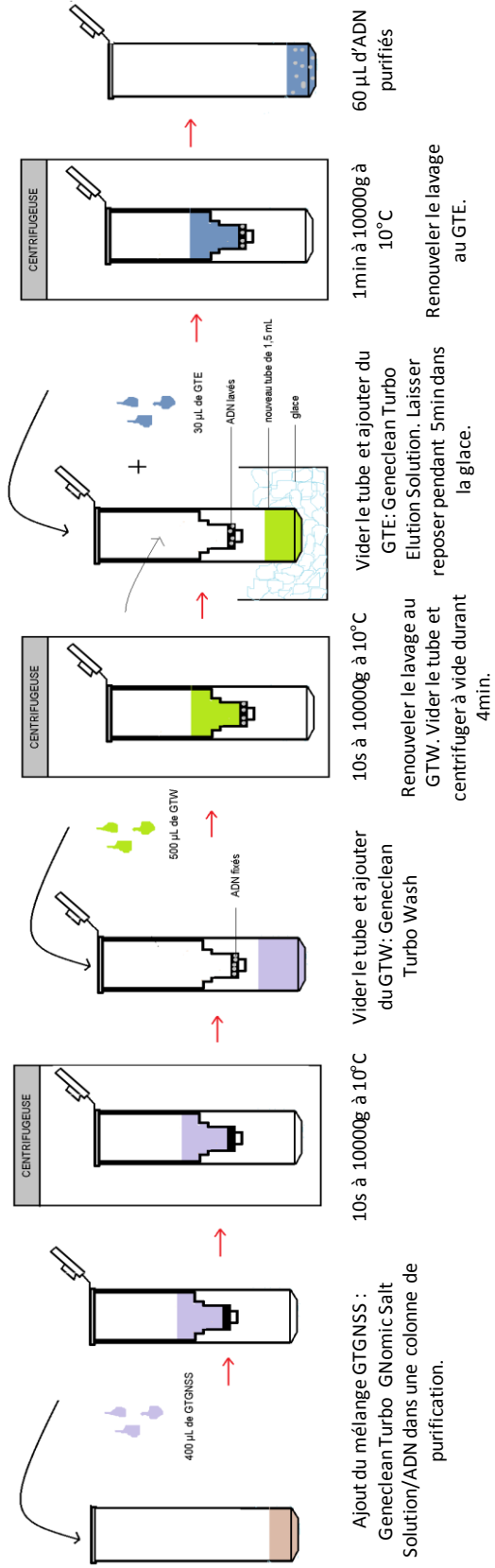


Figure 12: Schéma des étapes et composants d'une purification d'ADN

2) PCR quantitative

La PCR quantitative (Polymerase Chain Reaction) est une technique d'amplification d'ADN. Elle va permettre de déterminer le nombre de copies d'ADN ribosomal 16S pour les bactéries et 18S pour les champignons. Ce sont des gènes ubiquitaires qui vont permettre d'avoir une vision globale de la diversité bactérienne et fongique au sein d'un échantillon.

L'amplification de l'ADNr 18S pour les champignons est effectuée à partir de 2 ng d'ADN (2 μ L) dans un volume réactionnel final de 20 μ L contenant 10 μ L de Master Mix SybrGreen® (1X, Applied Biosystems, France), 2,5 μ L des amorces FR1 et FF390 (12,5 mM), 2 μ L d'eau, et 1 μ L de T4 gene 32 protéine (0,625 μ g, MP Biomedicals, France). Les réactions d'amplification des fragments ont été effectuées dans un thermocycleur « StepOne Plus » (Life technologies™, Saint-Aubin, France) avec un système de détection de fluorescence du SybrGreen® programmé comme suit : 10 min à 95°C (dénaturation initiale) ; 40 cycles successifs des trois phases suivantes : 15 sec à 95°C (dénaturation), 30 sec à 50°C (hybridation) et 1 min à 72°C (élongation).

L'amplification de l'ADNr 16S pour les bactéries est effectuée à partir de 2 ng d'ADN (2 μ L) dans un volume réactionnel final de 20 μ L contenant 10 μ L de Master Mix SybrGreen (1X), 2 μ L des amorces 341F et 515R (12,5 mM), 3 μ L d'eau, et 1 μ L de T4 apligene (0,625 μ g). Les réactions d'amplification des fragments ont été effectuées dans un thermocycleur StepOne Plus programmé comme suit : 1 min à 95°C (dénaturation initiale) ; 40 cycles successifs des trois phases suivantes : 15 sec à 95°C (dénaturation), 30 sec à 60°C (hybridation), et 30 sec à 72°C (élongation) (cf. Figure 13).

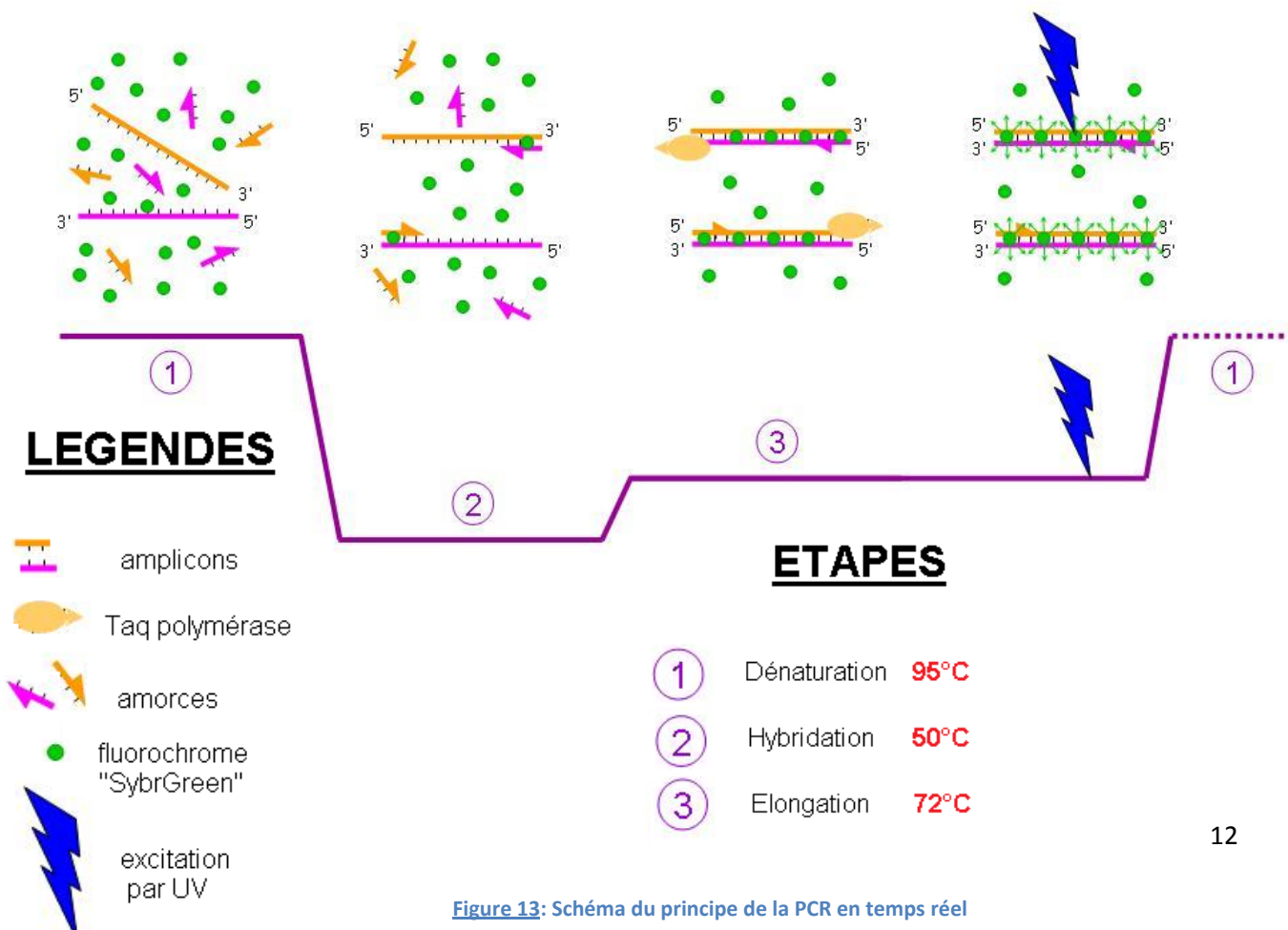


Figure 13: Schéma du principe de la PCR en temps réel

D. Analyses statistiques

Afin de collecter l'ensemble des données et les traiter, le logiciel Xlstat et le logiciel R ont été utilisés. Un test statistique a été utilisé, le test de Kruskal-Wallis, test non paramétrique. Il ne fait aucune hypothèse sur la forme des distributions sous-jacentes. Il travaillera non pas sur les valeurs des observations, mais sur leurs rangs, une fois ces observations réunies dans un seul méga-échantillon.

IV. Résultats et discussion

A. Impact des modes d'usage sur la biomasse microbienne

Le gel ci-dessous (cf. Figure 14) présente les résultats de l'extraction des ADN, il met en évidence des migrations d'ADN génomique. L'image obtenue nous montre que l'ADN extrait n'est pas dégradé (absence de smear) ce qui nous confirme que l'extraction d'ADN est réussie, qu'il est de bonne qualité et que l'on peut alors procéder de la sorte pour l'expérimentation de longue durée.

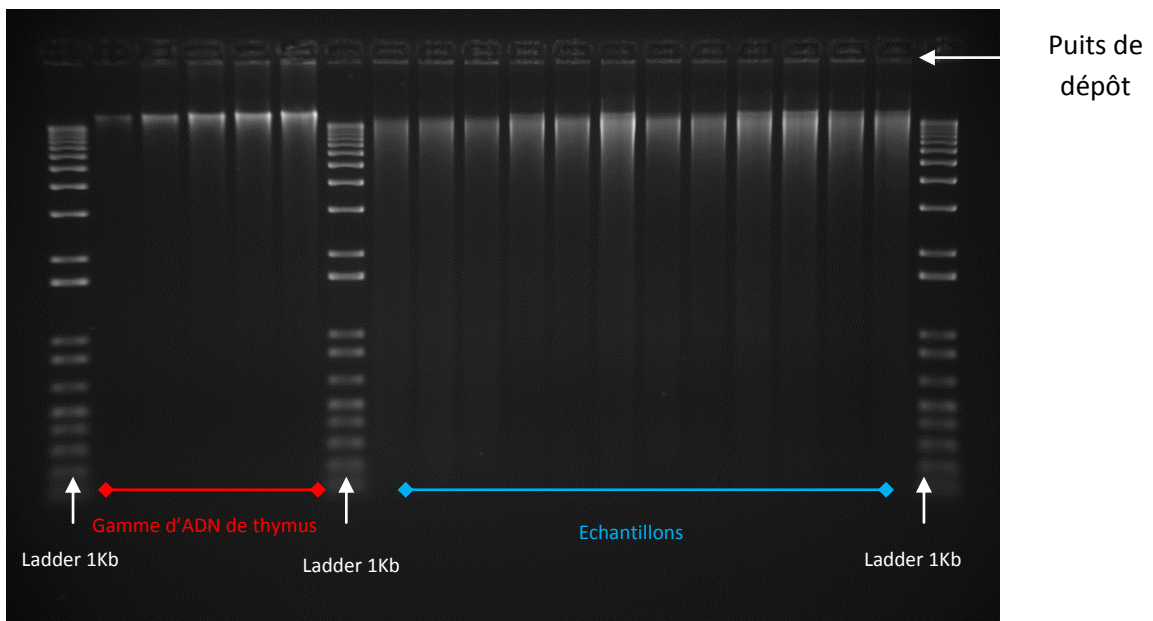


Figure 14: Photographie d'un gel d'électrophorèse après migration des ADN, sous cuve à UV

1) Cinétique temporelle pour chaque traitement

Les valeurs de biomasse moléculaire obtenues à partir des échantillons analysés sont reportées dans la figure 15. La biomasse moléculaire microbienne varie de 48 000 ng d'ADN/g de sol pour le plus faible (T2-Travail réduit en restitution de résidus-2010) à 62 000 ng d'ADN/g de sol pour le plus élevé (T3-Travail réduit en exportation de résidus-2011). Ces valeurs correspondent à des valeurs moyennes généralement observées dans les sols agricoles de ce type. En ce qui concerne le traitement n°1 -Labour en restitution de résidus- les

biomasses sont homogènes durant ces 4 ans, le test de Kruskal Wallis confirme que les données ne sont pas significativement différentes avec une p-value > 0,05. Le labour n'a probablement pas d'effet sur l'abondance des communautés microbiennes pour cet essai.

Pour le traitement n°2 –Travail réduit en restitution de résidu-, nous pouvons observer une stimulation de la biomasse dès la deuxième année qui se pérennise. En effet, le travail réduit du sol à un effet bénéfique car il permet la ré-oxygénation de la couche superficielle et donc une augmentation de la matière organique. Il est moins impactant que le labour (Alvarez *et al.*, 2000).

Le traitement n°3 –Travail réduit avec exportation des résidus- présente une stimulation résiliente de la biomasse. Cela pourrait s'interpréter par le fait que le travail réduit à eu un effet immédiat sur l'accroissement des communautés, mais la balance s'est vite inversée de part l'exportation des résidus dont l'impact négatif paraît plus important.

De même, le traitement n°4 –Labour avec faible apport azoté- suit une stimulation résiliente de la biomasse. Enfin, le traitement n°5 –Non travail par culture de Switchgrass- connaît une biomasse constante au cours du temps.

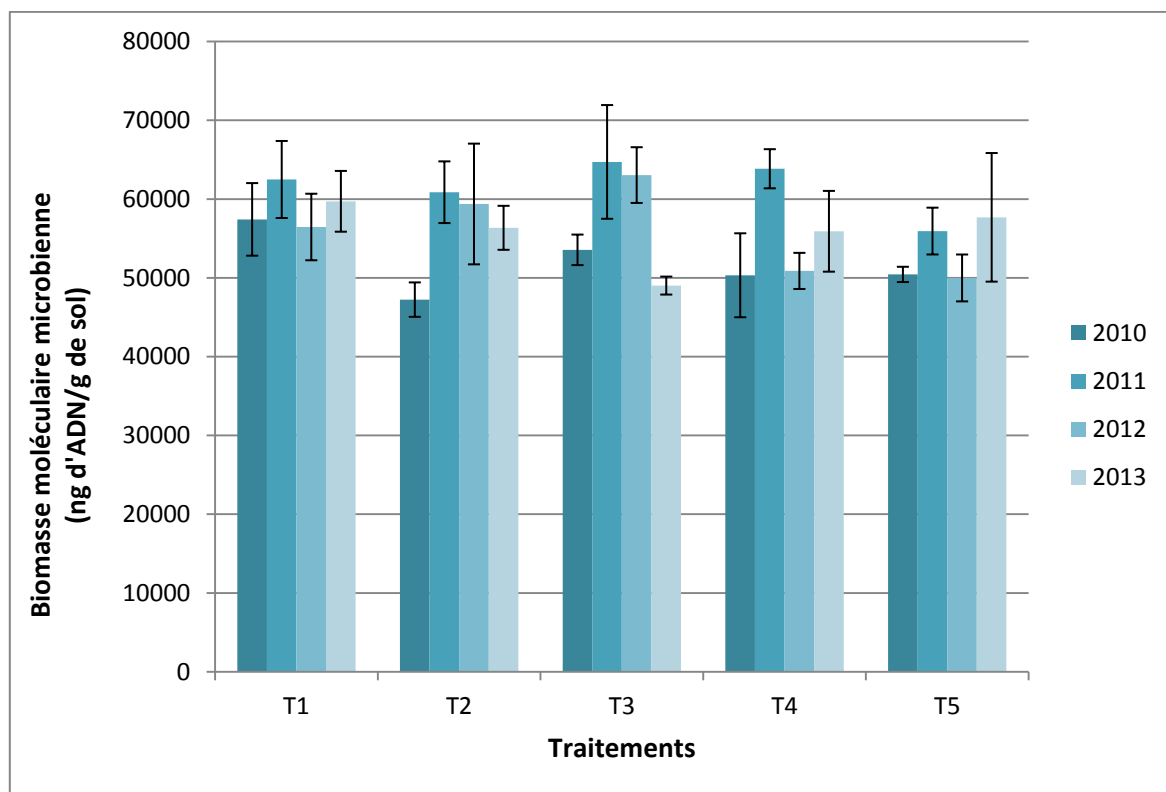


Figure 15: Evolution temporelle de la biomasse microbienne moléculaire des 5 traitements

Afin de rendre plus visuel l'effet du travail du sol, nous avons isolé T1-Labour en restitution de résidus- et T2 –Travail réduit en restitution de résidus- (cf. Figure 16).

2) Cinétique temporelle des traitements T1 et T2

Sur le graphique suivant (Figure 16), les valeurs de biomasse microbienne obtenues en 2010, qui correspondent au t_0 de l'essai (avant la différenciation des différents systèmes de culture), semblent naturellement inférieures pour le traitement T2 (travail réduit) par rapport au T1 (labour). Ceci met en évidence une hétérogénéité spatiale de la distribution de la biomasse moléculaire à l'échelle du site expérimental. Ceci est couramment observé dans les études réalisées au terrain.

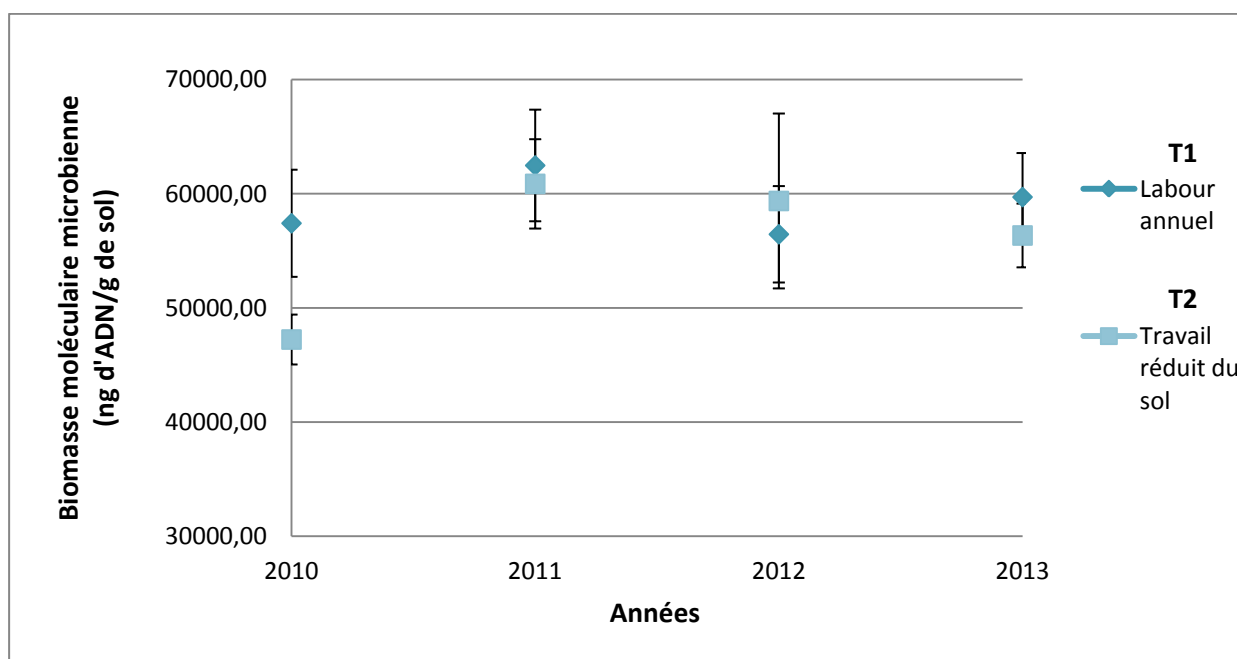


Figure 16: Effets du travail du sol sur la biomasse microbienne moléculaire par restitution des résidus

Pour T1, nous observons que la biomasse reste homogène pendant la durée de l'expérimentation (valeurs comprises entre 55 000 ng et 60 000 ng d'ADN/g sol). En revanche, pour T2, nous observons une forte stimulation de la biomasse en 2011 qui se pérennise (passage de 48 000 ng à 61 000 ng d'ADN/g sol). Bien que les biomasses microbiennes des deux traitements se confondent après l'année 2010 (t_0), il faut prendre en compte la différence d'amplitude liée à l'hétérogénéité de terrain de l'année initiale. Le profil de la courbe T2 se trouverait donc au dessus de T1 en conditions initiales similaires.

Ce graphique nous permet de dégager que le travail réduit du sol aurait une tendance à posséder une biomasse microbienne supérieure à celle d'un labour (Jiang *et al.*, 2011). Ce ne sont que des tendances, car le test de Kruskal-Wallis ne dégage pas de différence significative.

B. Impact des différents modes d'usage sur les densités bactériennes et fongiques

La biomasse microbienne est composée en grande partie de bactéries et de champignons. La PCR quantitative nous a permis de voir la densité de chacun (en nombre de copies d'ADNr 16S ou 18S/ g de sol) pour chaque échantillon.

1) Densité bactérienne

Les densités bactériennes obtenues sont représentées dans la figure 17 :

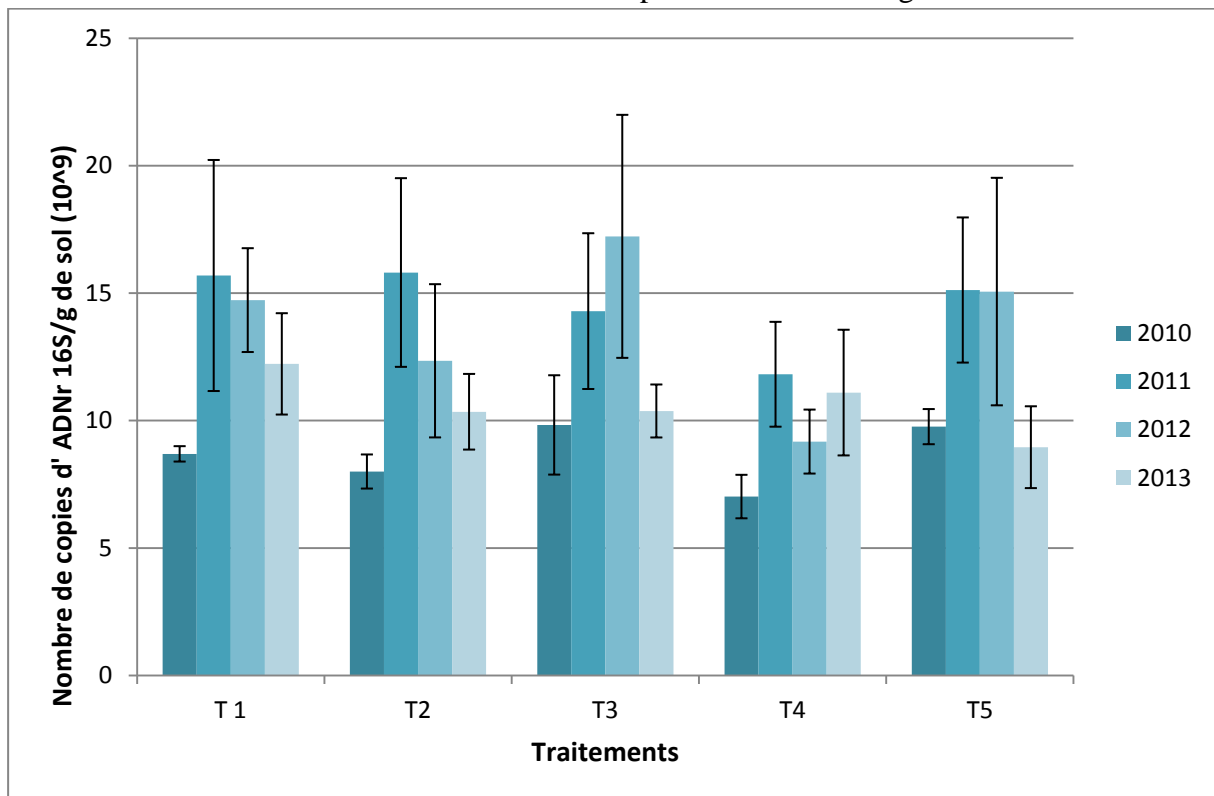


Figure 17: Evolution temporelle de la densité bactérienne pour les 5 traitements

Le traitement n°1 -Labour en restitution de résidus- connaît une stimulation résiliente de la densité bactérienne. Le pic d'augmentation en 2011 pourrait s'expliquer par le fait que le labour déstructure les gros agrégats et met à disposition les éléments nutritifs indispensables à la croissance bactérienne.

Pour le traitement n°2 -Travail réduit en restitution de résidu-, nous avons le même profil que pour le traitement T1. Le travail superficiel du sol semble impacter les densités bactériennes de la même manière que le labour.

Le traitement n°3 -Travail réduit avec exportation des résidus- présente une stimulation plus longue de la densité bactérienne. Comme vu dans la Figure 14, le travail réduit du sol a une tendance à stimuler la biomasse microbienne, d'où l'augmentation de la densité bactérienne observée pour les années 2011 et 2012. Pour ces années l'exportation des résidus (néfaste car ce sont des sources d'énergie pour les microorganismes) ne semble pas impacter les

communautés bactériennes. La tendance semble s'inverser en 2013, probablement due à un manque de ressource nutritive. Le traitement n°4 –Labour avec faible apport azoté- connaît une stimulation de la densité bactérienne en 2011 qui se stabilise les années suivantes. Les valeurs obtenues sont cependant inférieures à celles de tous les autres traitements. En comparant ces valeurs à celles du traitement T1, qui présente un sol labouré avec apports d'azote en concentrations non limitantes, il est possible que le faible apport d'azote entraîne une carence au niveau des parcelles pour le développement bactérien (Babujda *et al.*, 2010). Enfin, le traitement n°5 –Non travail par culture de Switchgrass- semble présenter une stimulation résiliente de la diversité bactérienne.

2) Densité fongique

De façon générale, les densités fongiques sont plus faibles que les densités bactériennes (10^9 copies d'ADNr 16S environ contre 10^8 copies d'ADNr 18S par gramme de sol). Les densités de champignons obtenues pour chaque traitement sont présentées dans la figure 18. Les différences obtenues pour chaque traitement au cours du temps sont très minimes compte tenu de l'échelle.

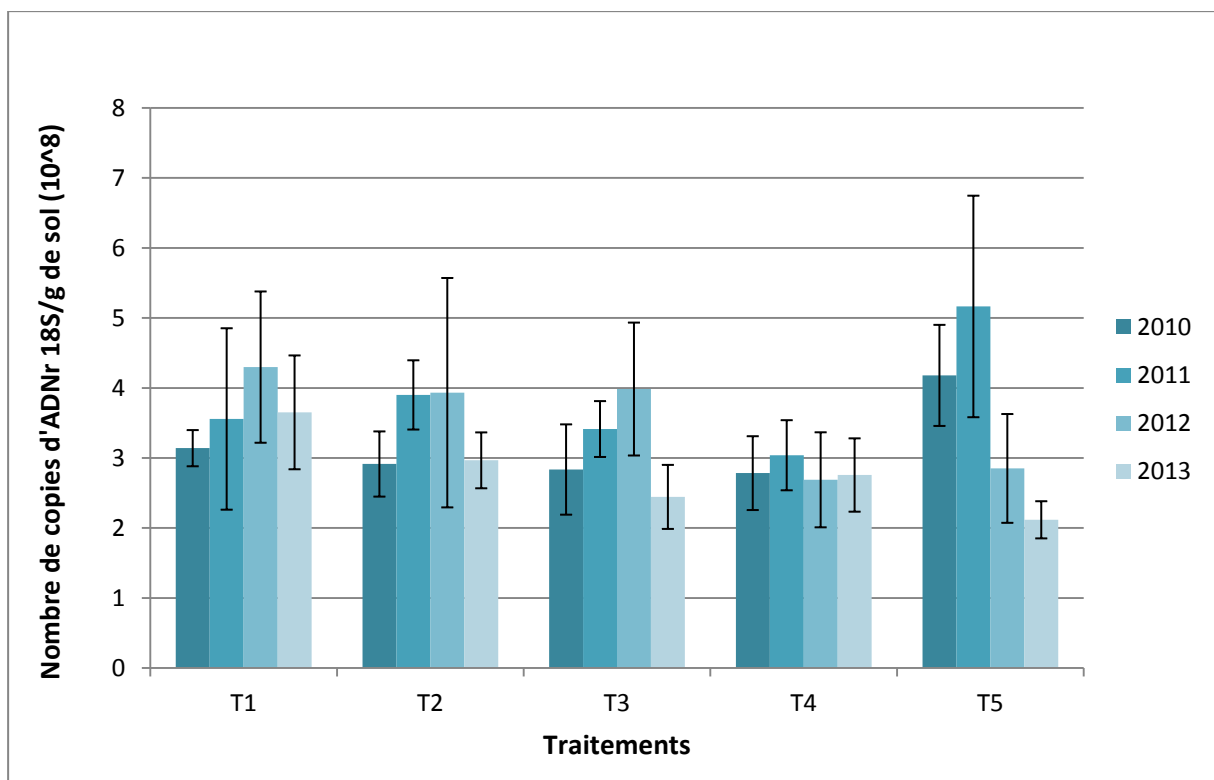


Figure 18: Evolution temporelle de la densité fongique pour les 5 traitements

Au sein des traitements T1, T2 et T3 les densités restent homogènes ($\pm 1.10^8$ copies d'ADNr 18S/g sol) et entre les traitements également. Nous n'observons pas de différence significative entre le labour et le travail réduit du sol sur les communautés fongiques. Cependant, le traitement n°4 –Labour avec faible apport azoté- présente des densités fongiques homogènes pour les 4 années, mais inférieures aux autres traitements. Comme pour

les bactéries, le faible apport d'azote semble être limitant pour le développement des champignons. Pour le dernier traitement –Non travail par culture de Switchgrass-, nous observons une stimulation de la densité fongique en 2011 car en effet, le non travail ne va pas fragmenter les réseaux mycéliens des champignons (qui apportent une grande zone de prospection) comparés à un labour. Cependant il est possible que les exsudats racinaires relargués par le Switchgrass, qui sont des sucres simples très faciles à assimiler par les bactéries, favorisent leur développement au détriment des champignons pour les années 2012 et 2013.

V. Conclusion

D'importants efforts ont été consentis afin de développer des systèmes innovants pour une agriculture durable et la préservation des ressources biologiques du sol qui sont non renouvelables. Afin de déterminer leurs impacts sur la qualité des sols, des indicateurs microbiens peuvent être utilisés. Les microorganismes du sol se développent dans leur quasi-totalité aux dépens de la matière organique, des débris végétaux ainsi que les exsudats racinaires dont la localisation influence directement celle des activités microbiennes. Les communautés microbiennes telluriques sont donc sensibles aux changements des modes de gestion des sols et sont directement reliées au fonctionnement biologique du sol par leur implication dans la décomposition de la matière organique et les cycles biogéochimiques.

Notre étude a permis de constater que l'adoption de différentes techniques de travail du sol a tendance à modifier en quatre ans l'abondance microbienne et les densités de bactéries et champignons des sols. En effet, un travail superficiel du sol tendrait à stimuler l'abondance microbienne et les densités bactériennes et fongiques, de même que la restitution des résidus de culture valoriserait le développement de la biomasse comparée à un export. Nous avons également pu montrer l'effet positif d'un apport d'azote sur ces communautés. Cela pourrait s'expliquer par les disparités des éléments nutritifs présents dans les sols. Le labour aurait tendance à les enfouir en profondeur, sur un horizon plus large, et leurs concentrations seraient moindres par rapport à un travail du sol réduit où les composés se concentreraient sur la couche superficielle du sol.

Pour approfondir cette hypothèse, une étude similaire sera effectuée sur les horizons 0-5 cm et 5-20 cm pour exacerber le contraste entre les différents modes de gestion des sols et notamment les effets du labour comparés à ceux d'un travail réduit.

Ces indicateurs donnent une première vision globale de la qualité microbiologique des sols, il devient maintenant nécessaire de passer au-delà et décrire la biodiversité et l'activité des communautés microbiennes telluriques. Pour cela des outils moléculaires tel que le pyroséquençage serviront à effectuer un inventaire taxonomique de la diversité microbienne des sols, et des outils plus fonctionnels tels que la quantification des flux de CO₂/N₂O serviront à étudier la capacité fonctionnelle des microorganismes sous ces différentes pratiques culturales.

BIBLIOGRAPHIE

PUBLICATIONS

Alvarez, C.R., Alvarez, R., (2000). Short-term effects of tillage systems on active soil microbial biomass. *Biol Fertil Soils* 31, 157-161.

Babujda, L.C., Hungria, M., Franchini, J.C., Brookes, P.C., (2010). Microbial biomass and activity at various soil depths in a Brazilian oxisol after two decades of no-tillage and conventional tillage. *Soil Biology & Biochemistry* 42, 2174-2181.

Bates, S.T., Berg-Lyons, D., Caporaso, J.G., Walters, W.A., Knight, R., *et al.* (2011). Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME J* 5: 908–917.

Feinstein, L.M., Sul, W.J. & Blackwood, C.B., (2009). Assessment of bias associated with incomplete extraction of microbial DNA from soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 5428-5433.

Jiang, X., Wright, A.L., Wang, J., Li, Z., (2011). Long-term tillage effects on the distribution patterns of microbial biomass and activities within soil aggregates. *Catena* 87, 276-280.

Marinari, S., Liburdi, K., Masciandaro, G., Ceccanti, B., Grego, S., (2007). Humification-mineralization pyrolytic indices and carbon fractions of soil under organic and conventional management in central Italy. *Soil and Tillage Research*. 92:10-7.

Parkinson, D., Coleman, D., (1991). Microbial communities, activity and biomass. *Agriculture Ecosystems and Environment*. Pp 3-33.

Plassart, P., Terrat, S., Thomson, B., Griffiths, R., Dequiedt, S., Lelievre, M., Regnier, T., Nowak, V., Bailey, M., Lemanceau, P., Bispo, A., Chabbi, A., Maron, P.A. & Mougél, C. (2012) Evaluation of the ISO Standard 11063 DNA Extraction Procedure for Assessing Soil Microbial Abundance and Community Structure. *PLoS ONE* 7(9): e44279. doi:10.1371/journal.pone.0044279

Ranjard, L., Lejon, D., Mougél, C., Scherer, L., Merdinoglu, D. & Chaussod, R. (2003). Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 5, 1111-1120.

Ranjard, L., Echairi, A., Nowak, V., Lejon, D.P.H., Nouaim, R. & Chaussod, R. (2006). Field and microcosm experiments to evaluate the effects of agricultural copper treatment on the density and genetic structure of microbial communities in two different soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 58, 303-315.

Roesch, LFW., Fulthorpe, RR., Riva, A., Casella, G., Hadwin, AKM., *et al.* (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J* 1: 283–290

Torsvik, V., Øvreås, L., (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 5: 240–245.

Whitman, WB., Coleman, DC., Wiebe, WJ., (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6578–6583.

OUVRAGES

Principes des techniques de biologie moléculaire par D. Tagu, C.Moussard, 2005. Editions INRA.

L'agronomie aujourd'hui par Thierry Doré, Marianne Le Bail, Philippe Martin, Bertrand Ney, Jean Roger-Estrade, 2006. Editions Quae.

EcoFINDERS Caractériser la biodiversité et le fonctionnement des sols en Europe 23 partenaires de 10 pays européens et la chine par Philippe Lemanceau, 2011. Biofutur, article vol 30/326, pp. 56-58

SITES INTERNET

www.dijon.inra.fr/ *visité le 24/05/2013*

www.set-revue.fr/sites/default/files/archives/SET_hors_serie_CHITRIT_0.pdf *visité le 03/06/2013*

www.agence-nationale-recherche.fr/programmes-de-recherche/environnement-et-ressources-biologiques/viabilite-et-adaptation-des-ecosystemes-productifs-territoires-et-ressources-aux-changements-globaux/fiche-projet-agrobiosphere/?tx_lwmsuivibilan_pi2%5BCODE%5D=ANR-11-AGRO-0004 *visité le 20/04/13*

Nom: BOUANCHEAU Manon

Nature: Rapport de stage de 1ère année de Master Sciences de l'Environnement, sur la période avril-juin 2013.

Titre: Evaluation de l'impact des pratiques agricoles sur l'abondance et la diversité des communautés microbiennes du sol.

Résumé:

Les sols assurent des fonctions fondamentales (alimentation, support, réservoir de diversité...) et sont de plus en plus fortement sollicités par les activités humaines, en particulier l'agriculture. Leur gestion est un enjeu majeur pour l'humanité car ces ressources ne sont pas renouvelables, et il est actuellement nécessaire de modifier nos pratiques culturales en vue d'une agriculture durable.

Afin d'évaluer l'impact des pratiques agricoles il existe de nombreux bioindicateurs (macro, méso et microfaunes) dont les bioindicateurs microbiens, sensibles aux changements de modes d'usage des sols de part leurs implications dans les cycles biogéochimiques et la décomposition de la matière organique. Dans ce contexte, mon stage a consisté à déterminer l'impact de différentes pratiques agricoles sur les communautés microbiennes telluriques en termes d'abondance et de diversité.

Pour cela des prélèvements ont été réalisés sur 20 parcelles d'un même site expérimental pendant quatre années. Ces parcelles présentaient 5 traitements différents de par le travail du sol mais aussi la restitution des résidus de culture et la fertilisation azotée. La biomasse microbienne ainsi que les densités bactériennes et fongiques ont été quantifiées à l'aide de techniques de biologie moléculaire.

Il a ainsi été mis en évidence une tendance au développement microbien face à un travail réduit du sol, à une restitution des résidus et un apport d'azote. Tous ces éléments contribueraient donc à la fertilité des sols. En revanche, le labour nous montre une hétérogénéité des biomasses dans le temps. Ces informations pourront servir à mettre au point des systèmes innovants et participer au maintien d'une agriculture durable.

Mots clés: Sol, Travail du sol, Communautés microbiennes, Biomasse, Diversité, Indicateurs biologiques.

Maîtres de stage: Mr MARON Pierre-Alain & Mlle BOURGEOIS Emilie

Laboratoire de recherche: INRA DE DIJON, UMR Agroécologie – Plateforme Génosol, 17, rue de Sully 321000 DIJON.