



**HAL**  
open science

# Etude de la réponse des communautés bactériennes du sol aux changements des modes de gestion dans les agrosystèmes

Eléonore Attard

► **To cite this version:**

Eléonore Attard. Etude de la réponse des communautés bactériennes du sol aux changements des modes de gestion dans les agrosystèmes. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Poitiers, 2008. Français. NNT: . tel-02818108

**HAL Id: tel-02818108**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02818108>**

Submitted on 6 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.

# THESE

pour l'obtention du Grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS  
(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)  
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

Ecole Doctorale : ICBG

Présentée par :

**Eléonore ATTARD**

<p><b>Etude de la réponse des communautés bactériennes du sol aux changements des modes de gestion dans les agrosystèmes</b></p>
--

**Directeurs de Thèse :**

**A. AMBLES, Professeur, Université de Poitiers**  
**X. LE ROUX, Directeur de Recherche, INRA, Lyon**  
**S. RECOUS, Directrice de Recherche, INRA, Reims**

Soutenue le 11 juillet 2008

devant la Commission d'Examen

\*\*\*\*\*

## **JURY**

G. Lemaire, Directeur de Recherche, INRA, Lusignan	Président
A. Brauman, Directeur de Recherche, IRD, Montpellier	Rapporteur
R. Merckx, Professeur, Université Louvain, Belgique	Rapporteur
A. Amblès, Professeur, Université de Poitiers	Examineur
X. Le Roux, Directeur de Recherche, INRA, Lyon	Examineur
S. Recous, Directrice de Recherche, INRA, Reims	Examineur



## **REMERCIEMENTS**

Tout d'abord, je voulais remercier spécialement Gilles Lemaire, François Gastal, André Amblès, Xavier Le Roux et Sylvie Recous sans qui cette thèse n'aurait pas pu voir le jour.

Merci aux départements INRA EA, EFPA et à la région Poitou-Charentes pour le financement de cette bourse de thèse.

Je tiens également à remercier René Bally pour son accueil au laboratoire d'Ecologie Microbienne de Lyon.

Merci aux membres du jury et notamment à Alain Brauman et Roel Merckx d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et d'effectuer un si long trajet pour cette soutenance.

Mes remerciements les plus sincères iront à mes 2 directeurs de thèse Xavier Le Roux et Sylvie Recous qui ont appliqué parfaitement cette fameuse phrase décrivant la formation de doctorat « une formation à la recherche par la recherche ». Merci pour leur soutien, leur présence, leur inventivité, leur gentillesse, leur sens de la pédagogie....J'en oublie sûrement... Ce fut vraiment un réel plaisir de travailler au jour le jour avec eux... Si je pouvais remonter le temps.... Et bien... je ne changerai rien –rires-.

Je continuerai ces remerciements de manière « géographique » puisque cette thèse a été plutôt « nomade ».

### **En Picardie :**

Merci aux 2 Eric pour m'avoir largement aidé dans les nombreux et parfois éreintants prélèvements de sol. Une mention spéciale à Eric Gréhan pour son humour (comique de répétition évidemment). Merci à Florence Barrois pour sa gentillesse, son aide et son professionnalisme dans la technique des flux bruts.

Merci à Olivier Delfosse pour les mesures spectro, à faire, refaire et rerefaire...

### **Dans la Vienne :**

Merci à André Amblès pour avoir accepté de diriger cette thèse administrativement si compliquée. Mais pourtant, grâce à son aide précieuse, tout aura toujours été très simple.

Merci également au secrétariat de l'université de Poitiers qui m'a également permis de simplifier de nombreuses tâches administratives.

Merci à toutes les personnes m'ayant aidé à prélever tout ce sol sur l'ORE de Lusignan (j'espère en avoir laissé suffisamment pour les prochaines études –rires-). Un remerciement spécial à Florie pour les bavardes parties de tamisage de sol et l'hébergement en « 4 étoiles » à Lusignan.

Merci à Claude Cantot pour sa gentillesse et sa disponibilité envers sa « thésarde éloignée » ; Xavier Charrier pour toute l'aide dans l'organisation de mes missions, sa gentillesse tout simplement.

Merci à Gilles Lemaire, François Gastal, Abad Chabbi pour leur accueil dans leurs unités, leur aide et leur implication dans ce projet.

### **Tout au bout de la ligne du RER D**

Merci à François Laurent pour son implication dans le projet, pour avoir pu utiliser ce site expérimental d'Arvalis mais aussi pour les longs détours faits jusqu'à la gare de Massy.

### **Dans les Pyrénées-Atlantiques :**

Merci à Robert Duran et à ces très sympathiques étudiants (encore merci à Sylvain et Ludo) pour leur accueil et l'aide dans les manip faites dans leur laboratoire d'Ecologie Moléculaire de Pau.

### **Dans les volcans :**

A quelqu'un qui fait apercevoir que oui, je pouvais m'épanouir dans le monde de la recherche. Merci Jean Devaux, je fais encore très bien la daphnie.

Merci à Katja pour son accueil et son aide lors des prélèvements faits à l'INRA de Clermont.

### **A Lyon :**

#### **Dans ma fabuleuse équipe :**

Un énorme merci à Franck Poly toujours disponible pour répondre à mes nombreuses questions, avec ses nombreuses solutions magiques devant les problèmes de bio mol...

Sans oublier ces bonnes blagounettes avec Xavier : j'ai vécu 4 années comprenant bien plus d'un 1<sup>er</sup> avril par an...

Un autre énorme merci à Joana Falcao-Salles pour son soutien, son aide, sa gentillesse sans limite, son optimisme, sa bonne humeur quotidienne.

Merci à Claire Commeaux et Nadine Guillaumaud, les exceptionnelles techniciennes. Merci de m'avoir formée à ces nombreuses techniques d'écologie microbienne, merci pour votre disponibilité, votre organisation sans faille, votre gentillesse.

A mon « dadounet californien », petit malin qui a mis un océan entre nous au moment de ma rédaction alors que moi j'avais supporté la sienne –rires-. Pour ces quelques discussions houleuses pour s'apercevoir que nous avons le même point de vue !!! trop fort ce dad !!! Pour toutes les pauses et soirées si sympas.

Merci également à Fabien et Nadia pour m'avoir changé les idées, et soutenue sur cette fin de thèse.

#### **Au labo en général :**

Merci à Pierre Pujic qui a notamment égayé quelques unes des longues journées passées dans la même salle de manip.

Merci à Dominique, Christine et Stéphane pour avoir géré avec le sourire mes très nombreuses missions majoritairement bien anticipées (si si je vous jure) mais aussi parfois au dernier moment.

Merci à tous les étudiants qui font qu'une si bonne ambiance règne dans ce labo. Un merci très spécial à Arnault, élément particulièrement destressant, mais aussi à Guillaume, Denis, Aymeric, Camille, Béné, Aude, Marina et Hervé... Les soirées, notamment les soirées Wii, risquent fort de me manquer.

Mais aussi en dehors du labo :

Un très grand merci à Kratouf et Krystel pour les soirées détente hors champ scientifique mais aussi pour les très nombreuses fois où Pierre et moi étions en déplacement et qu'il fallait garder nos 2 petits monstres à poil.

**Dans ma Haute-Loire natale et là où les cigales chantent :**

A ma famille. Vraiment merci, merci beaucoup pour toute cette gentillesse et ce soutien que j'ai l'impression de pas avoir suffisamment mérité. Mention très spéciale à Serge, Sabine et Gérard, Romain, et mes grands-parents.

Et puis, plus précisément merci à mes parents. Merci de vous être « décarcassés » pour moi pendant toutes ces longues années d'étude. Quelle chanceuse je suis...

Enfin merci énormément à Pierre, celui qui a du « supporter » au jour le jour ce choix de projet professionnel parfois si contraignant d'un point de vue personnel. Qui l'eut cru, il y a 8 ans, que ce si pragmatique étudiant se ferait embrigader dans cette aventure incertaine et périlleuse –rires-. Tout simplement et avec tout mon cœur, merci de m'avoir soutenue depuis le tout début et de me soutenir encore.

Fin d'une thèse heureuse...



# **SOMMAIRE**



**Préambule : Contexte général sur les changements de mode de gestion des terres**

1. Le développement et l'intensification de l'agriculture ..... 1

2. Etudes des changements de modes de gestion et de leurs conséquences environnementales..... 2

3. La place des micro-organismes dans les études analysant les effets des changements de mode de gestion sur le système sol..... 3

**CHAPITRE 1**

**Partie 1 :**

**Synthèse bibliographique sur les acquis et les limites des études portant sur la réponse des communautés bactériennes soumises à des changements de mode de gestion**

1- Importance de la prise en compte des échelles spatio-temporelles dans ces études

    1.1. Echelle temporelle ..... 7

    1.2 Echelle spatiale..... 10

2. Conception du plan expérimental ..... 12

3. Intérêt d'analyser la réponse de différents groupes fonctionnels bactériens pour l'étude des effets des changements de mode de gestion ..... 12

4. Transferts de sols entre écosystèmes: des études intéressantes dans le contexte de l'analyse des effets des changements de mode de gestion ..... 14

<b>5. Représentation de la composante microbienne dans les études analysant les effets des changements de mode de gestion.....</b>	<b>14</b>
<b>6. Intérêts et limites de la prise en compte des différentes caractéristiques (activité, effectif, diversité) des communautés bactériennes</b>	
6.1. Prise en compte d'une seule caractéristique.....	16
6.2 Prise en compte de 2 caractéristiques des communautés bactériennes	
6.2.1 Activité et effectif des communautés bactériennes .....	18
6.2.2 Structure et effectif des communautés bactériennes .....	19
6.2.3 Structure et activité des communautés bactériennes .....	20
6.3. Caractérisation de 3 caractéristiques des communautés bactériennes .....	22
<b>7. Intérêt de la mesure des flux bruts d'azote pour les études portant sur la réponse des communautés bactériennes du sol aux changements de mode de gestion.....</b>	<b>24</b>
<b>8. Conclusion .....</b>	<b>26</b>

## **Partie 2 :**

### **Objectifs scientifiques et choix des situations agronomiques et des communautés bactériennes pour ce travail de thèse**

<b>1. Les principaux objectifs de la thèse .....</b>	<b>28</b>
<b>2. Contexte agronomique et choix de situations de changement de mode de gestion pour notre étude .....</b>	<b>30</b>
2.1 Conversion entre modes de gestion intensif et extensif de prairies pâturées .....	30
2.2 Conversion réciproque entre prairie et culture dans le cadre de la réintroduction de prairies temporaires dans les rotations culturales .....	31
2.3 Conversion réciproque entre labour et non labour en situation de grande culture.....	31

2.4. Choix des situations et dispositifs agronomiques pour notre étude par rapport à ce contexte agronomique .....	32
--	----

### **3. Le cycle de l'azote et les communautés fonctionnelles bactériennes impliquées dans ce cycle : choix des communautés étudiées pour notre étude**

3.1. Rappels sur le cycle de l'azote dans les sols .....	34
3.2. Choix des communautés bactériennes.....	37

## **Partie 3 :**

### **Variables mesurées et méthodes utilisées**

1. Dosage des concentrations en azote minéral, azote organique et carbone organique.....	39
2. Mesure des activités potentielles des communautés bactériennes hétérotrophes nitrifiante et dénitrifiante .....	40
3. Mesure des flux bruts d'azote (minéralisation, organisation, nitrification) .....	40
4. Estimation des effectifs bactériens.....	41
5. Mesure de la structure génétique des communautés bactérienne	
6. Caractérisation de la diversité des communautés par clonage-séquençage.....	44
7 Analyses statistiques.....	45

## CHAPITRE 2

### Etude de l'impact de changements de régimes de pâturage sur la structure de la communauté bactérienne de sols prairiaux

<b>Préambule</b> .....	47
<b>1. Introduction</b> .....	52
<b>2. Materials and methods</b> .....	53
2.1. Experimental design .....	53
2.2. Soil sampling.....	54
2.3. Soil fractionation .....	54
2.4. Genetic structure of the eubacterial community .....	55
2.5. Total soil organic carbon.....	56
2.6. Plant species composition .....	56
2.7. Statistical analyses.....	56
<b>3. Results</b> .....	57
3.1. Effects of changes in grazing regime on the bacterial community structure in whole soil .....	57
3.2. Effects of change in grazing regime on plant species composition and total soil organic carbon content .....	57
3.3 Effects of change in grazing regime on the bacterial community structure in soil fractions .....	58
<b>4. Discussion</b> .....	59
4.1. Does the kinetics of changes in the bacterial community differ between application and cessation of grazing?.....	59
4.2. Do changes in plant species composition and soil organic carbon content explain the modification of the bacterial community structure? .....	59
4.3. Does the micro-localisation of bacteria influence their response to change in grazing regime?.....	60
<b>References</b> .....	62

## CHAPITRE 3

### **Etude de l'impact de changements de mode de travail du sol sur l'activité, l'abondance et structure de la communauté nitrifiante dans des sols cultivés**

<b>Préambule</b> .....	66
<b>Introduction</b> .....	71
<b>Experimental procedure</b> .....	71
Study site, treatments and soil sampling .....	72
Assays for nitrite-oxidizing enzyme activity .....	73
Soil DNA extraction and measurement of <i>Nitrobacter</i> -like <i>nxrA</i> copy abundance by quantitative PCR .....	73
Characterization of <i>Nitrobacter</i> -like NOB community structure by PCR-DGGE targeting <i>nxrA</i> .....	74
Cloning and sequencing of <i>nxrA</i> fragments and phylogenetic analysis.....	75
Determination of gross ammonification and gross ammonium immobilization by the <sup>15</sup> N dilution technique .....	76
Measurements of soil environmental variables .....	76
Data analyses and statistical tests.....	77
<b>Results</b> .....	77
Nitrite-oxidizing enzyme activity.....	77
Relationship between NOEA and <i>Nitrobacter</i> -like <i>nxrA</i> copy number.....	78
Correlation between NOEA and gross ammonification rate, soil moisture and organic carbon content .....	78
<i>Nitrobacter</i> -like NOB community structure and correlation with NOEA.....	78
Phylogeny of partial <i>nxrA</i> sequences retrieved from soils.....	79
<b>Discussion</b> .....	79

NOEA in tilled and no-tilled systems, and response to changes in tillage practices .....	79
Environmental determinants of the NOEA response to tillage practices.....	80
Relationship between NOEA and the abundance and diversity of <i>Nitrobacter</i> -like nitrite oxidizers.....	81
<b>References</b> .....	84
<b>Etude en microcosme de la réponse de la communauté bactérienne nitratante à des changements de conditions environnementales</b> .....	88

## CHAPITRE 4

### **Etude de l'impact de changements de mode de gestion dans des agroécosystèmes sur l'activité, l'abondance et structure de la communauté dénitrifiante**

<b>Préambule</b> .....	90
<b>Introduction</b> .....	95
<b>Material and methods</b> .....	96
Study sites, treatments and soil sampling.....	96
Denitrification potential assays .....	97
Soil DNA extraction and characterization of the denitrifying community structure by PCR-DGGE.....	98
Measurement of <i>nirK</i> copy abundance by quantitative PCR .....	99
Measurements of soil nitrate and organic carbon contents .....	99
Data analyses and statistical tests.....	99
<b>Results</b> .....	100
Effects of changes in land-use on denitrification potential .....	100

Effects of changes in land-use on total and dissolved organic carbon.....	100
Relationship between denitrification potential and the genetic structure and the size of the denitrifying community.....	101
Relationship between changes in denitrification potential and soil environmental variables .....	102
Unravelling relative effects of environmental factors and denitrifier abundance on denitrification potential .....	102
<b>Discussion</b> .....	103
Changes of denitrification potential after changes in land-use and tillage practices .....	103
Importance of denitrifiers abundance and community structure to understand changes in denitrification potential .....	104
Importance of environmental factors to understand changes in denitrification potential .	106
<b>References</b> .....	109

## CHAPITRE 5

### **Dynamique de l'azote et du carbone dans un sol sous culture et sous prairie, et effets à court terme du changement de mode d'occupation.**

<b>Introduction</b> .....	113
<b>1. Matériel et Méthodes</b> .....	114
1.1. Site d'étude.....	114
1.2 Traitements expérimentaux .....	114
1.3. Prélèvement de sols.....	115
1.4. Détermination des flux bruts d'azote par la technique <sup>15</sup> N .....	115
1.5. Dosages du Carbone Organique Total, du Carbone Organique Dissous, de la Biomasse Microbienne et du C-CO <sub>2</sub> respiré .....	116
1.6. Expérience associée : mesure des flux nets de C et N après retournement de la prairie .....	117
1.7. Tests statistiques.....	118

<b>2. Résultats</b> .....	119
2.1. Flux bruts d'azote.....	119
2.2. Carbone Organique Total, Carbone Organique Dissous et Biomasse microbienne ..	120
2.3. Relations entre flux d'azote et carbone organique.....	121
2.4. Minéralisation nette de C et N .....	121
<b>3. Discussion</b> .....	122
3.1. Fonctionnement comparé des sols sous prairie et sous grande culture .....	122
3.2. Effets des changements de mode de gestion sur la dynamique d'azote et de carbone	123
3.3. Rôle du cycle interne de l'azote sur la disponibilité nette de N dans le sol.....	125
3.4. Relations entre flux d'azote et dynamique du carbone.....	126
<b>4. Conclusion</b> .....	127

## CHAPITRE 6

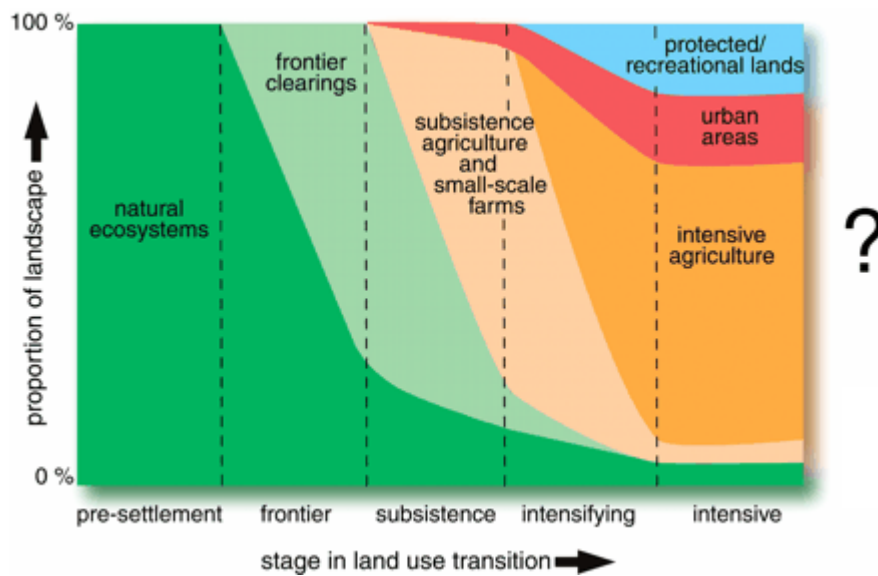
<b>Discussion générale et perspectives</b> .....	129
<b>1. Originalités de notre étude</b> .....	129
<b>2. Synthèse et discussions des résultats</b> .....	132
2.1 Amplitude et temps de réponse des activités bactériennes du sol face aux changements de mode de gestion .....	132
2.2 Amplitude et temps de réponse des structures génétiques des communautés bactériennes.....	133
2.3. Quelles relations entre changements d'activités et changements de structure génétique et/ou d'effectifs ? .....	135
2.3.1 Un lien faible entre changements d'activités et de structures génétiques.....	135
2.3.2 Un lien plus fort entre changements d'activités et d'effectifs.....	136
2.4 Quelles relations entre changements d'activités et changements de variables environnementales et de disponibilité en substrat.....	137
2.5 Synthèse des principales variables déterminant les activités bactériennes .....	138



<b>3. Limites de notre étude</b> .....	140
<b>4. Perspectives</b> .....	142
4.1. Futurs compléments à l'étude .....	142
4.2. Eléments « supplémentaires » .....	143
4.3. Implications de nos conclusions pour la modélisation.....	144
4.4. Conséquences de nos résultats pour la gestion des agrosystèmes.....	146
<b>Références bibliographiques</b> .....	148
<b><u>ANNEXE 1</u> : Productions scientifiques de la thèse</b> .....	162
<b><u>ANNEXE 2</u> : article analysant la réponse de la nitrification et des nitritants après changement du régime de pâturage en prairie</b> .....	166

## **Préambule**

**Contexte général : les changements de mode de  
gestion des terres**



**Figure 1:** Suite aux transitions démographiques et économiques, les sociétés semblent suivre une séquence dans les différents modes de gestion qu'elles adoptent. Les différentes régions du monde sont à différentes étapes de cette séquence selon leur histoire, leurs conditions socio-économiques et leurs contextes écologiques. D'après Foley et al. (2005)

---

## **Préambule :**

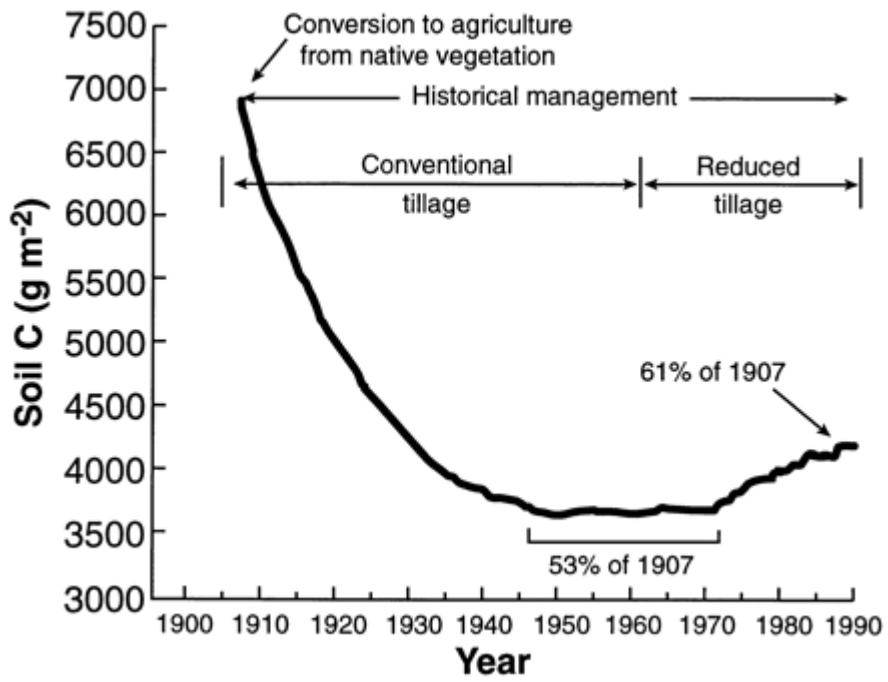
# **Contexte général sur les changements de mode de gestion des terres**

---

### **1. Le développement et l'intensification de l'agriculture**

Le mode de gestion des terres fut longtemps considéré comme un problème à retombées essentiellement locales mais, actuellement, il apparaît comme un facteur présentant des conséquences plus globales (Foley et al., 2005). En effet, les changements de mode de gestion des terres liés à l'agriculture se sont produits, et se produisent encore, sur de très grandes surfaces de la planète : selon les estimations proposées par Vitousek et al. (1997), un tiers à la moitié de la surface de la terre aurait été sujette à des modifications d'origine anthropique. Ces changements sont de nature très différente : il peut s'agir de conversion de forêts en terres arables ou en prairies, ou de l'intensification des cultures par exemple (Fig. 1 d'après Foley et al., 2005). Le point commun de tous ces changements est leur origine dictée par les contraintes et les besoins engendrés par les activités humaines.

La remarquable intensification de l'agriculture qui s'est déroulée au cours du dernier siècle a permis de doubler la production mondiale de nourriture en augmentant la surface agricole de seulement 10 % (Tilman, 1999). Cela a pu être réalisé grâce à la sélection de cultivars de plantes à haut rendement, à l'usage de l'irrigation, à la mécanisation, et à l'utilisation massive de fertilisants et de pesticides. Malheureusement, ces changements se sont déroulés au prix d'une dégradation des conditions environnementales. La conversion des forêts en terres cultivées et le labour des sols arables sont ainsi mis en cause pour leur participation dans les émissions de gaz à effet de serre (CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O) (Johnson et al., 2007). L'usage croissant des différents pesticides et fertilisants associés à l'agriculture intensive est à l'origine de fréquents problèmes de contamination et de potabilité des eaux et notamment de l'eutrophisation des eaux douces et marines (Khan and Ansari, 2005; Glibert et al., 2006; Csatho et al., 2007). Ces changements de gestion des terres entraînent également la modification et la fragmentation des habitats naturels avec leurs conséquences sur la biodiversité (Robinson and Sutherland, 2002). Enfin, les techniques de culture intensive peuvent engendrer une dégradation des propriétés physico-chimiques du sol, telles que la teneur en matière organique (Fig. 2), avec à terme des pertes de fertilité, voire même

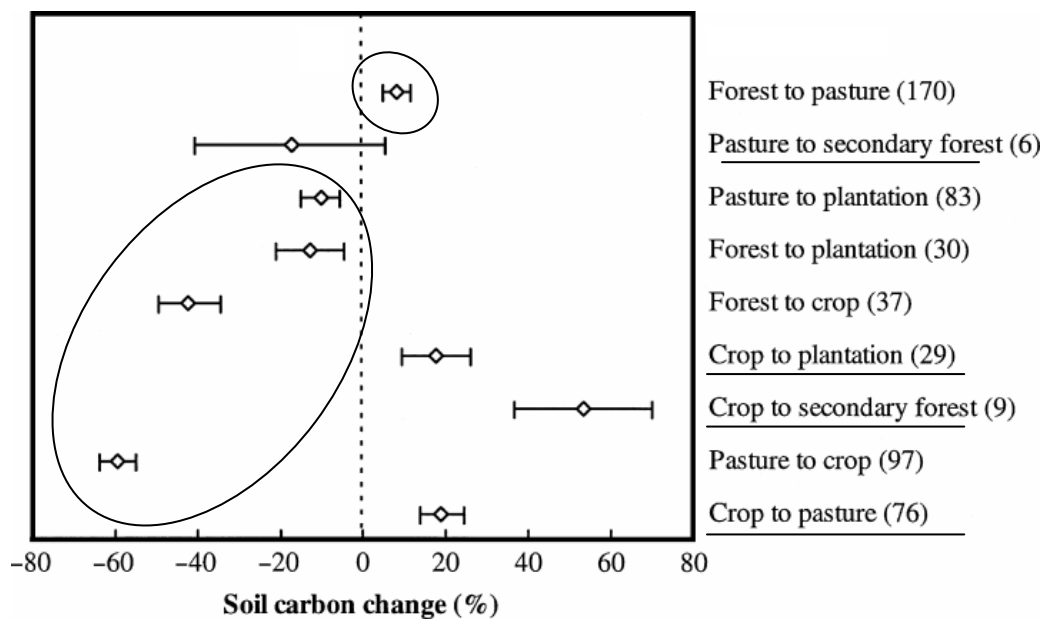


**Figure 2:** Simulation des changements des stocks de C (horizon de sol 0-20cm) dans les zones agricoles tempérées aux USA. D'après Matson et al. (1997)

d'érosion des couches superficielles du sol. Certains changements de gestion des terres et l'intensification des modes de gestion se révèlent donc à la fois nécessaires aux besoins humains (en terme notamment de production de nourriture) mais également à l'origine de conditions environnementales dégradées, permettant d'anticiper une perte plus ou moins intense et plus ou moins durable des services fournis par les écosystèmes (Hooper et al., 2005; Diaz et al., 2007). Depuis plus d'une décennie et surtout depuis le sommet de Rio de Janeiro, la prise de conscience des enjeux environnementaux liés aux pratiques agricoles a eu tendance à promouvoir des modes de gestion des terres plus respectueux de l'environnement, parmi lesquels l'extensification agricole associée au concept d'agriculture durable. En guise d'exemple, l'on peut citer la mise en place des systèmes de rotation de cultures pour lutter plus efficacement contre les ravageurs des cultures, pour limiter la compaction du sol, pour améliorer la fertilité des sols et pour une mieux gérer les adventices. Parmi ces nouvelles pratiques plus respectueuses de l'environnement s'inscrit également un usage plus raisonné des pesticides et l'interdiction des formulations les plus nocives. Enfin, l'on peut citer de nouvelles techniques réduisant ou supprimant le labour des sols agricoles qui ont fait leur apparition afin de lutter contre les effets négatifs liés au labour conventionnel (Fig. 2). Face à ces nombreuses nouvelles pratiques agricoles, un enjeu est de savoir quelle est l'inertie du système sol lors de la dé-intensification des modes de gestion. Sachant que l'on peut assister à un retour à des modes de gestion intensifs sur des systèmes gérés extensivement auparavant (par exemple retour à des pratiques de labour sur des systèmes gérés en non-labour durant des années), l'inertie du système sol lors d'une intensification des modes de gestion reste une question en suspens.

## **2. Etudes des changements de modes de gestion et de leurs conséquences environnementales**

Durant ces dernières décennies, les conséquences des changements des systèmes de production agricole ont fait l'objet de nombreuses études. Par exemple, Matson et al. (1997) ont pu déterminer un effet important des pratiques culturales sur les stocks de carbone avec une baisse rapide et intense due au labour conventionnel (Fig. 2). En parallèle, la mise en place de techniques de labour réduit entraîne une hausse des stocks mais beaucoup plus lente (Fig. 2). En compilant les résultats de plusieurs études Post et Kwon (2000), Guo et Gifford (2002) et Murty et al. (2002) ont pu dresser un bilan de carbone du sol globalement négatif pour les contextes de déforestation et d'intensification (par exemple mise en culture de



**Figure 3:** Réponse du stock de carbone du sol après divers changements de mode de gestion. D'après Guo and Gifford, 2002 .

prairies) et positif pour ceux de reforestation et d'extensification (par exemple installation de prairie sur d'anciennes cultures) (Fig. 3).

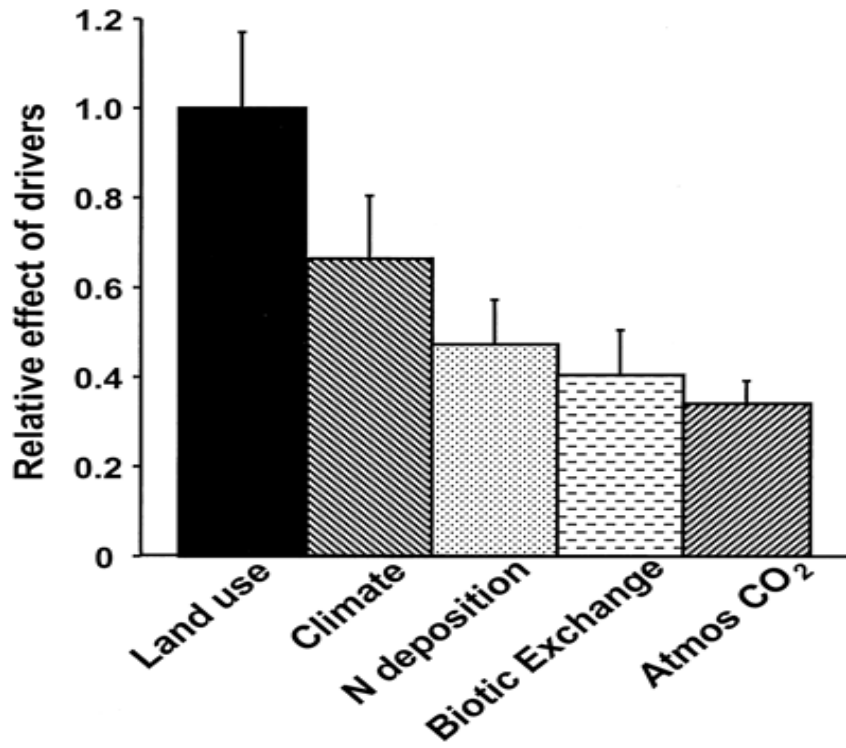
Concernant l'effet de ces changements de modes de gestion des agrosystèmes sur les émissions de gaz à effet de serre, l'étude réalisée par Mosier et al. (1997) a également montré un impact plus fort sur ces émissions de l'intensification des modes de gestion mais pas d'effet de l'extensification. Plus précisément, la conversion d'une prairie en culture a conduit à une forte augmentation de l'émission de N<sub>2</sub>O (gaz 300 fois plus puissant que le CO<sub>2</sub>) pendant au moins les 3 premières années, alors que la conversion réciproque (culture vers prairie) ne permet pas une baisse mais plutôt un maintien du niveau d'émission, et ce, même plusieurs années après les changements.

Les changements de modes de gestion peuvent donc avoir des impacts considérables sur les processus écologiques et, par extrapolation, sur les services rendus par les écosystèmes tels que la régulation du climat, des cycles biogéochimiques, le contrôle de l'érosion, la formation du sol, le rôle d'habitat pour les êtres vivants, la production de nourriture, d'énergie, de matériaux, la source de divertissement, de patrimoine génétique (Costanza et al., 1997). Ces changements de pratiques peuvent influencer les processus écosystémiques directement *via* leurs effets physiques ou chimiques, et indirectement *via* leurs effets sur la biodiversité (changement de la composition, du nombre d'espèces et-ou altération des capacités des espèces, Diaz et al., 2007). Selon le scénario prédictif de Sala et al. (2000), ces changements de pratiques constitueraient d'ailleurs le facteur majeur des changements de biodiversité, et ce, plus fortement que le changement climatique, l'augmentation du dépôt d'azote ou du CO<sub>2</sub> atmosphérique, et les échanges biotiques (Fig. 4). Cet impact a été attribué aux changements drastiques des habitats causés par les changements de modes de gestion, qui modifient les conditions environnementales, elles-mêmes déterminant des modifications voire des disparitions d'espèces.

### **3. La place des micro-organismes dans les études analysant les effets des changements de mode de gestion sur le système sol**

Les microorganismes jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement de l'écosystème: la décomposition de la matière organique, le maintien de la structure du sol, la transformation des nutriments et la production de gaz à effet de serre *via* les cycles biogéochimiques (carbone et azote essentiellement). De nombreuses connaissances ont été acquises sur les effets des changements de mode de gestion des terres sur les stocks de carbone ou les émissions de gaz à effet de serre (CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, CH<sub>4</sub>). Par contre, les





**Figure 4:** Effet relatif des principaux facteurs pilotant les changements de biodiversité, simulation pour l'année 2100. D'après Sala et al. (2000).

connaissances sur les microorganismes à l'origine de ces processus et sur leur réponse aux changements de mode de gestion sont encore trop rares. En 1999, Tiedje et al. (1999) ont utilisé le terme de « boîte noire » pour définir la vision du compartiment microbien utilisée par la plupart des études des trois précédentes portant sur les cycles biogéochimiques au cours. Ceci est particulièrement vrai des études analysant des effets des changements de mode de gestion sur les cycles biogéochimiques. Par exemple, on peut citer les travaux de Baggs et al. (2006) et Prieme et al. (1997) qui ont respectivement étudié les flux de N<sub>2</sub>O et CH<sub>4</sub> après labour et reforestation sans étudier explicitement le compartiment microbien. Pourtant les communautés bactériennes (dénitrifiantes et méthanogènes) sont largement responsables des émissions de gaz à effet de serre: ne pas les étudier ou caractériser globalement le compartiment microbien (par une mesure de biomasse microbienne totale, par exemple) permet de constater les effets des modes de gestion sur des processus cruciaux en terme d'émission de gaz à effet de serre, mais ne permet pas d'expliquer les différences observées par une compréhension des modifications survenues au niveau des acteurs microbiens impliqués. On peut donc se demander jusqu'où la caractérisation des microorganismes pourrait améliorer notre compréhension et nos capacités à prédire les modifications des cycles biogéochimiques dans le sol dans le contexte des changements de mode de gestion (Smith et al., 1998; Balser et al., 2006).

Ma thèse est constituée de 6 parties :

**Le 1<sup>er</sup> chapitre**, qui constitue l'introduction générale de cette thèse, inclura :

- une **première partie** présentant une synthèse bibliographique portant sur les acquis et les limites des études analysant la réponse des communautés bactériennes soumises à des changements de mode de gestion.

- une **deuxième partie** présentant et argumentant les objectifs scientifiques et les contextes agronomiques de la thèse

- une **troisième partie** qui présentera les démarches de mon étude.

**Les quatre chapitres suivants** présenteront, sous forme d'articles acceptés, soumis ou en préparation, les résultats que j'ai obtenus, concernant différentes facettes de mon analyse des réponses des communautés bactériennes du sol à des changements de mode de gestion dans les agroécosystèmes.



Enfin, **le sixième et dernier chapitre** se composera d'une synthèse des résultats obtenus et d'une discussion générale sur ces travaux.

**En annexe**, est fournie une liste des publications et des conférences où ont été présentés ces travaux et un article (correspondant à des travaux auxquels j'ai participé) sur les effets des changements de pâturage sur le couplage entre l'activité, l'abondance et la structure génétique de la communauté des bactéries nitrifiantes oxydant l'ammonium.



## **Chapitre 1- Partie 1**

**Synthèse bibliographique : les acquis et les limites  
des études portant sur la réponse des communautés  
bactériennes soumises à des changements de mode  
de gestion**



---

## **Premier chapitre - Partie 1 :**

### **Synthèse bibliographique sur les acquis et les limites des études portant sur la réponse des communautés bactériennes soumises à des changements de mode de gestion**

---

Identifier la bibliographie sur les effets des changements de mode de gestion sur les communautés bactériennes s'est avérée délicate pour 2 raisons : (i) peu d'études d'écologie microbienne ont été réalisées dans ce contexte et (ii) les études pertinentes ne sont pas aisées à identifier. En effet, comme évoqué dans le précédent chapitre, la question des effets des changements de mode de gestion des terres est très prégnante pour les sciences traitant des flux de gaz à effet de serre, des stocks de carbone et d'azote dans les sols et des macroorganismes du sol. Les études d'écologie microbienne ont quant à elles majoritairement abordé la réponse des communautés bactériennes aux modes de gestion agricole en comparant les caractéristiques de ces communautés dans différents contextes agricoles (par exemple, différences entre prairie et culture, labour et non labour, systèmes fertilisés et non fertilisés) mais sans étudier la dynamique des communautés face aux changements de gestion fréquemment subis par les écosystèmes.

Plus encore, l'aspect « changement » de mode de gestion des terres n'est pas forcément mis en avant dans les résumés, les titres et les mots-clés de ces études, alors que dans certains cas les auteurs ont travaillé sur des sites ayant effectivement subi des changements de leur mode de gestion. Cet aspect des études se cache parfois derrière le terme "successional". Par exemple, dans l'étude portant sur la communauté nitrifiante réalisée par Bruns et al. (1999), l'un de leurs traitements nommé "historically successional plots" correspond en fait à un abandon de la culture et à la mise en place d'une prairie. Un autre exemple est l'étude de Freitag et al. (2005) qui titre sur les effets de la fertilisation azotée alors que le dispositif expérimental leur permet d'étudier les effets d'un changement de mode de fertilisation sur les bactéries nitrifiantes. A l'opposé, il est assez fréquent de trouver des études mettant en avant le contexte de « land-use change » sans travailler réellement sur ce sujet. Par exemple, Bossio et al. (2005) titrent « Soil microbial response to land-use change.... » pour une étude comparative des caractéristiques microbiennes du sol entre différents modes de gestion des terres. En conclusion, une recherche avec les mots-clés «land-use change », « land-use conversion », etc. ne permet d'identifier qu'une partie des études





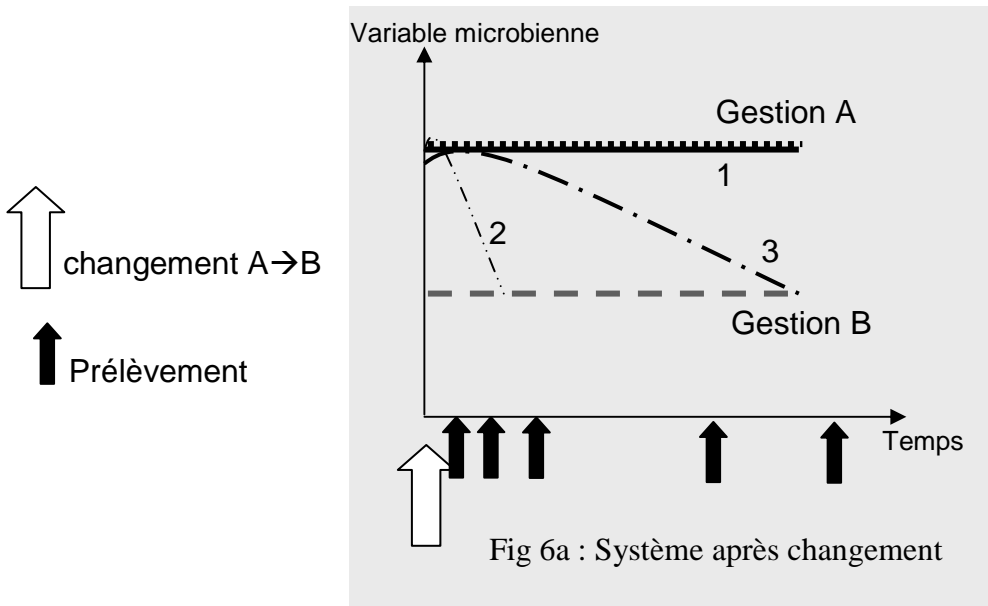
portant sur les effets des changements de mode de gestion à partir de la littérature disponible en écologie microbienne. La majorité des études évoquées dans cette synthèse ont donc été trouvées lors de recherches effectuées avec des mots-clés tels que « effects of management » « effects of tillage » « effects of fertilisation »... ou en recherchant des études sur certains groupes fonctionnels microbiens étudiés *in situ*. Bien que mes recherches bibliographiques aient essayé de pallier ces difficultés sémantiques, cette synthèse bibliographique n'est donc sans doute pas exhaustive. Au final, mes propos seront basés sur l'analyse de 40 études portant sur les changements de mode de gestion et leurs effets sur les caractéristiques des communautés bactériennes du sol. Cette synthèse bibliographique se restreindra aux études sur le compartiment bactérien de la microflore du sol afin d'introduire mon travail de thèse qui a été réalisé exclusivement sur les bactéries. Cependant, il faut noter que différentes études ont porté sur les effets de l'intensification et de la dé-intensification des modes de gestion sur les caractéristiques des communautés fongiques du sol (par exemple Klein et al., 1995; Bardgett et al., 1996; Donnison et al., 2000; Zeller et al., 2000; Zeller et al., 2001).

## **1- Importance de la prise en compte des échelles spatio-temporelles dans ces études**

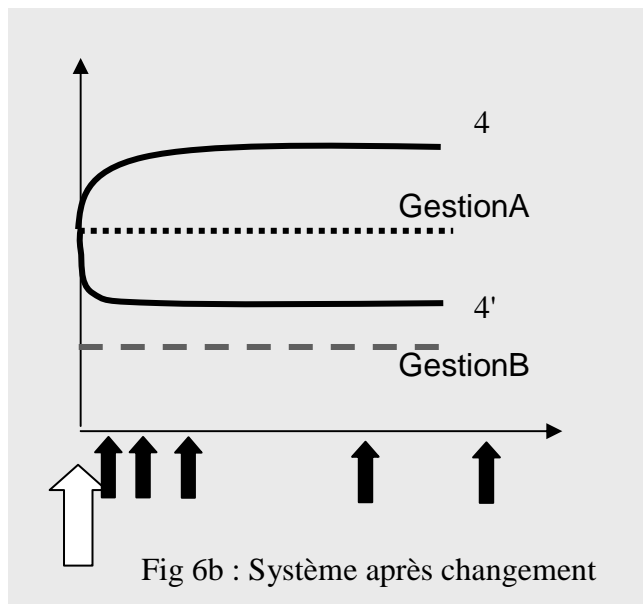
### **1.1. Echelle temporelle**

Très majoritairement (dans environ 70% des études) l'analyse de la réponse des communautés bactériennes soumises à des changements de mode de gestion a été faite à partir d'un seul prélèvement et non de prélèvements faits à plusieurs dates. Le choix de cette stratégie d'échantillonnage est dicté par la question que se posent les auteurs. Si le but est de déterminer si une caractéristique de la communauté bactérienne va réagir à un changement de gestion après un temps donné, une étude utilisant un seul point de prélèvement est appropriée. Par exemple, Buckley et Schmidt (2001) observent que, après 7 années, l'abandon de la culture dans un système céréalier en Grande Bretagne a effectivement un effet sur la structure de la communauté bactérienne du sol qui se différencie de celle présente dans les sols cultivés et dans les sols jamais cultivés.

Par contre, si une des questions de l'étude porte sur la mise en place des changements des caractéristiques des communautés bactériennes après le changement de gestion, une étude « en cinétique », comportant plusieurs points de prélèvements s'avère nécessaire. Par exemple, il est possible de voir, dès la 1ère année après mise en culture d'anciennes prairies, une modification de la structure génétique de la communauté des *Burkholderia* qui devient



- 1- Réponse d'une communauté très résistante dont les caractéristiques restent pilotées par l'ancien mode de gestion A
- ... 2- Réponse d'une communauté peu résistante dont les caractéristiques sont très vite pilotées par le nouveau mode de gestion B
- . - 3- Réponse d'une communauté moyennement résistante dont les caractéristiques restent longtemps pilotées à la fois à la fois par le nouveau et l'ancien modes de gestion B



- 4 et 4'- Réponse d'une communauté dans le cas où celle-ci atteint un nouvel état dépendant à la fois de l'ancien et du nouveau modes de gestion A et B

**Figure 5:** Capacités de résistance possible d'une caractéristique d'une communauté bactérienne après des changements de mode de gestion

similaire à la structure des communautés typiques de sols sous cultures (Salles et al., 2006a). Par contre, dans le cas d'une implantation de prairies sur des sols auparavant cultivés, le temps pour observer une structure génétique de la communauté des *Burkholderia* similaire à celle typique des sols sous prairies est supérieur à 4 années. Si un seul prélèvement avait été réalisé, cela n'aurait pas permis de mesurer à quel point la conversion de prairie vers culture entraînait une réponse drastique par rapport au changement inverse (culture vers prairie) et à quel point les modifications de structures étaient longues à apparaître dans le cas de l'implantation de prairie. De telles études décrivant la cinétique de réponse des caractéristiques des communautés bactériennes peuvent également analyser l'impact de l'histoire culturelle passée, et notamment savoir si et pendant combien de temps la gestion passée influence les communautés bactériennes du sol. Certains auteurs traduisent ceci en terme de capacités de résistance de la communauté considérée (Fig. 5).

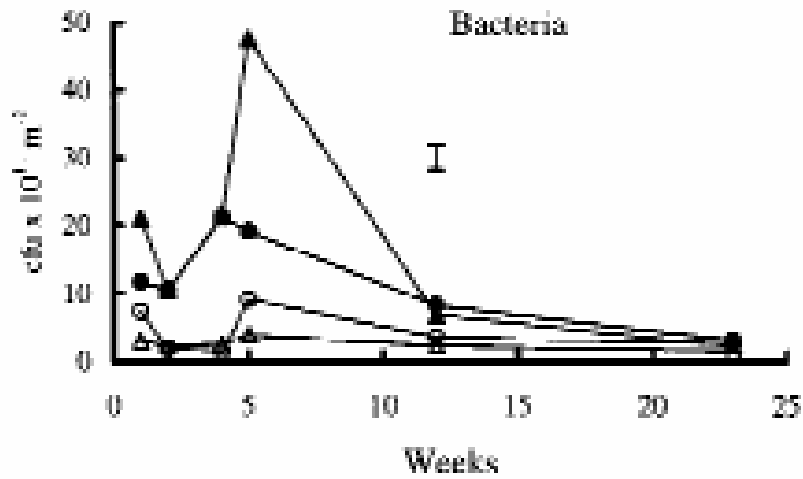
**La résistance** de la communauté correspond à la capacité de cette communauté à rester inchangée après une perturbation. Une communauté bactérienne dotée d'une grande capacité de résistance ne sera donc que très faiblement modifiée suite à une perturbation donnée. Une communauté moins résistante sera, quant à elle, plus altérée par la même perturbation (Gunderson, 2000) : les capacités de résistance de la communauté face à une perturbation vont dépendre de ses caractéristiques intrinsèques. Par exemple, on peut supposer qu'un changement de gestion n'aura pas les mêmes conséquences sur le fonctionnement des communautés des AOB -Ammonium Oxidizing Bacteria- que sur celui des communautés des dénitrifiants (respectivement, un groupe restreint en terme de diversité taxonomique, représenté par de faibles effectifs, et un groupe plus divers en terme de diversité taxonomique et fonctionnelle et avec de plus forts effectifs). De plus, au sein d'une communauté bactérienne, ses différentes caractéristiques pourront être plus ou moins résistantes: par exemple l'activité d'une communauté peut-être plus rapidement affectée que sa structure (ce point sera discuté plus longuement dans le chapitre suivant).

La figure 5 permet de visualiser schématiquement ce concept et ses implications en terme de prélèvements à réaliser.

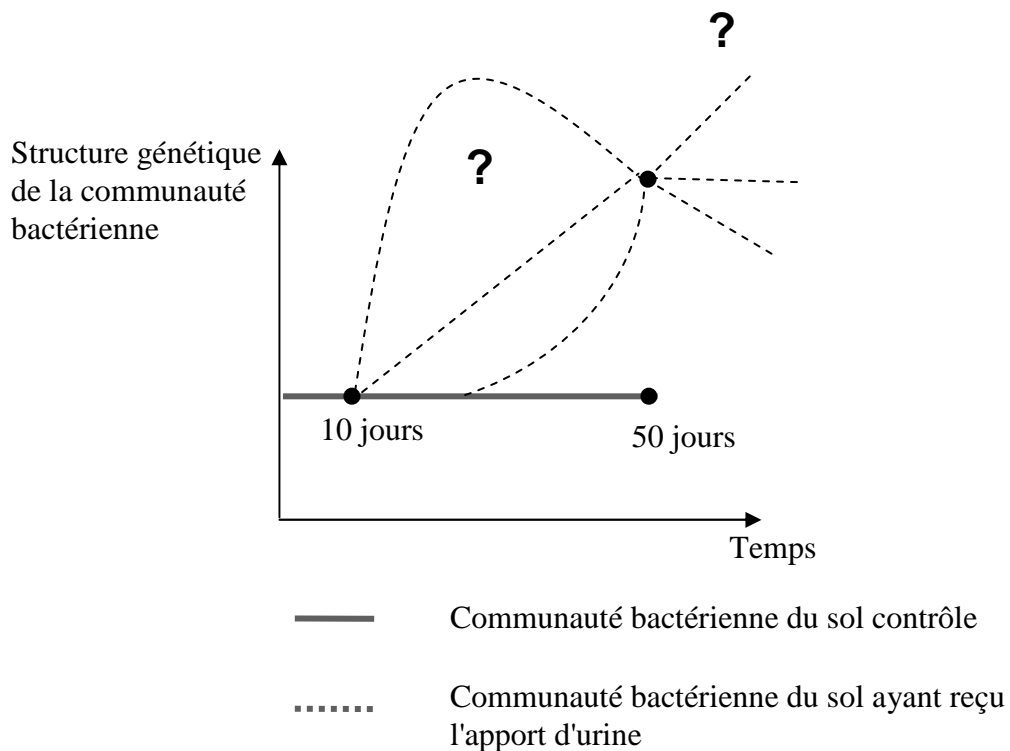
La communauté 1 est très résistante face à un changement de la gestion A vers la gestion B. Elle ne se montre pas ou peu affectée, et reste pilotée par la gestion initiale A.

La communauté 2 est peu résistante et ses caractéristiques varient très vite après le changement de gestion.

La communauté 3 présente des capacités de résistance moyenne. Elle est affectée mais plus lentement que la communauté 2.



**Figure 6** : Exemple d'un suivi fin (nombreuses dates de prélèvement) de la cinétique des effectifs bactériens après un apport d'urine. D'après Williams et al. (2000).



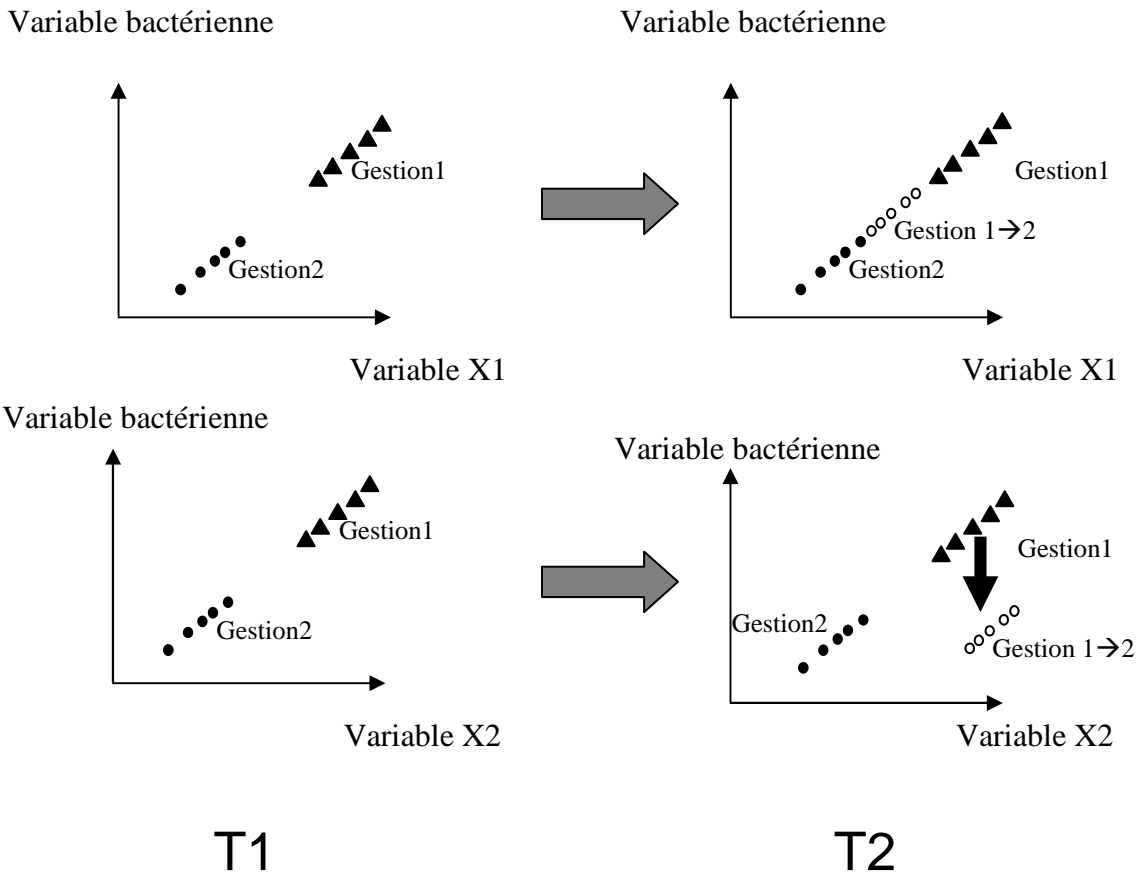
**Figure 7**: Schéma illustrant les résultats d'une étude ne permettant pas de préciser la cinétique de la réponse de la structure de la communauté bactérienne après un apport d'urine D'après Rooney et al. (2006).

Il faut noter que différents types de réponse peuvent exister pour un type de résistance donnée. Ainsi, les communautés 2 et 4 sont peu résistantes. Mais, alors que les caractéristiques de la communauté 2 deviennent très vite similaires de celles typiques de la gestion B, les caractéristiques de la communauté 4 vont rester durablement différentes de celles typiques des gestions A ou B. La communauté 4 est alors pilotée par la gestion actuelle B mais également par son histoire (gestion A).

Dans le cas de la communauté 2, on voit l'intérêt de suivre assez finement la cinétique de réponse des caractéristiques de la communauté et des variables qui l'influencent, notamment au début de l'expérience. Dans le cas de la communauté 3, on voit l'intérêt de prolonger l'étude assez longtemps.

De plus, utiliser plusieurs dates de prélèvements après le changement de gestion permet d'augmenter la probabilité d'observer d'éventuelles réponses transitoires. Un exemple est donné par le travail de Williams et al. (2000) qui a porté sur la réponse de la communauté bactérienne à un apport d'urine synthétique considéré comme un facteur majeur associé au pâturage en prairie (Fig. 6). Grâce à un suivi des effectifs bactériens en début d'expérience par des prélèvements fréquents, ils ont décrit l'effet transitoire de l'apport d'urine sur les effectifs bactériens au bout de 5 semaines. Sans ces prélèvements précoces, les auteurs auraient pu conclure à une absence d'effet puisque celui s'estompe dès la 12<sup>ème</sup> semaine (Fig. 6). Par contre, Rooney et al. (2006) ont choisi une approche qui nous semble moins adaptée (Fig. 7). Les auteurs n'observent pas d'effet de l'apport d'urine sur la structure génétique de la communauté bactérienne après 10 jours et un effet important après 50 jours. Ce travail ne permet donc pas de conclure sur la réponse de la communauté bactérienne au cours de la période 10-50 jours. Plus encore, il n'y a pas de possibilité d'évaluer la durée de l'impact sur la communauté bactérienne au-delà de 50 jours (Fig. 7).

Etudier la réponse des caractéristiques d'une communauté bactérienne à un changement de mode de gestion en utilisant un pas de temps suffisamment fin pour mesurer les prélèvements peut aussi aider à identifier les variables environnementales clés pilotant les caractéristiques microbiennes. Ceci est souvent difficile par simple comparaison de sols soumis depuis des années à des gestions différentes car il existe alors souvent une forte auto-corrélation entre différentes variables environnementales (matière organique, teneur en eau, pH, disponibilité en azote). Une étude qui suit dans le temps les modifications des caractéristiques bactériennes et des variables environnementales édaphiques peut tirer partie du fait que toutes les variables ne vont pas être modifiées à la même vitesse pour mieux



**Figure 8:** Le suivi en parallèle des changements des caractéristiques bactériennes et des variables environnementales peut permettre de mieux identifier les variables environnementales contrôlant la réponse la communauté bactérienne. Les 2 variables environnementales x1 et x2 sont bien corrélés à T1 à la variable bactérienne. Par contre, les résultats à T2 montrent que la variable environnementale bactérienne est bien corrélée de façon robuste à x1 mais pas à x2.

identifier les facteurs de contrôle possibles sur les caractéristiques des communautés bactériennes. Comme le schématise la Figure 8, à un premier prélèvement une variable bactérienne étudiée peut être corrélée à plusieurs variables environnementales. Par contre, à un 2<sup>ème</sup> prélèvement une seule variable x1 peut apparaître corrélée à la variable microbienne, montrant alors que la variable environnementale x2 n'est pas un déterminant majeur pilotant les variations bactériennes.

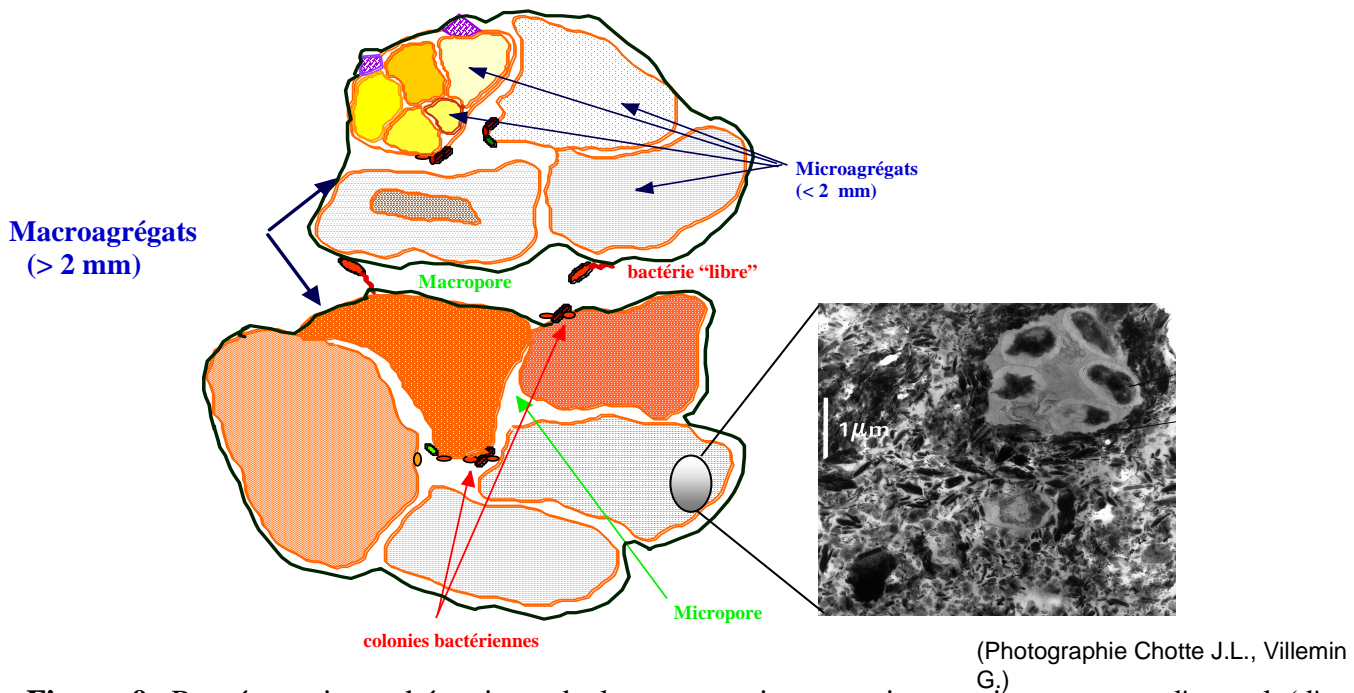
Enfin, la durée de ce type d'étude sera à déterminer en fonction de la nature du changement de gestion et l'intensité des perturbations associées aux différentes gestions. Par exemple, Webster et al. (2005) ont porté leur attention sur la réponse d'une communauté bactérienne peu abondante et peu diverse (les nitrifiants) suite à l'apport d'une quantité d'urée correspondant aux quantités associées au pâturage par des ovins (1mg d'urée/g sol). Ils ont donc opté pour une durée très courte (84 j) qui s'est révélée suffisante pour observer des changements importants de structure de la communauté nitrifiante. A l'opposé, Buckley et Schmidt (2001) ont ciblé la communauté bactérienne, communauté très diverse, après l'implantation de prairies sur d'anciennes parcelles cultivées. Ceci correspond à un arrêt de perturbations telles que le labour et la fertilisation. Dans cette situation, même après 7 années, la structure de la communauté dans les sols avec arrêt de la culture reste différente de celle observée dans les sols jamais cultivés.

En conclusion, si une étude vise à savoir si un changement de gestion peut générer, au bout d'un temps suffisamment long, une modification des caractéristiques d'une communauté bactérienne du sol, un prélèvement unique pourra s'avérer suffisant. Par contre, s'il s'agit de connaître l'échelle de temps de réponse et de caractériser précisément les capacités de résistance d'une communauté, il sera plus approprié d'utiliser un nombre suffisant de prélèvements judicieusement répartis dans le temps. Enfin, la durée totale de l'étude sera fonction des caractéristiques de la communauté bactérienne ciblée et de la nature du changement de mode de gestion ainsi que des perturbations associées.

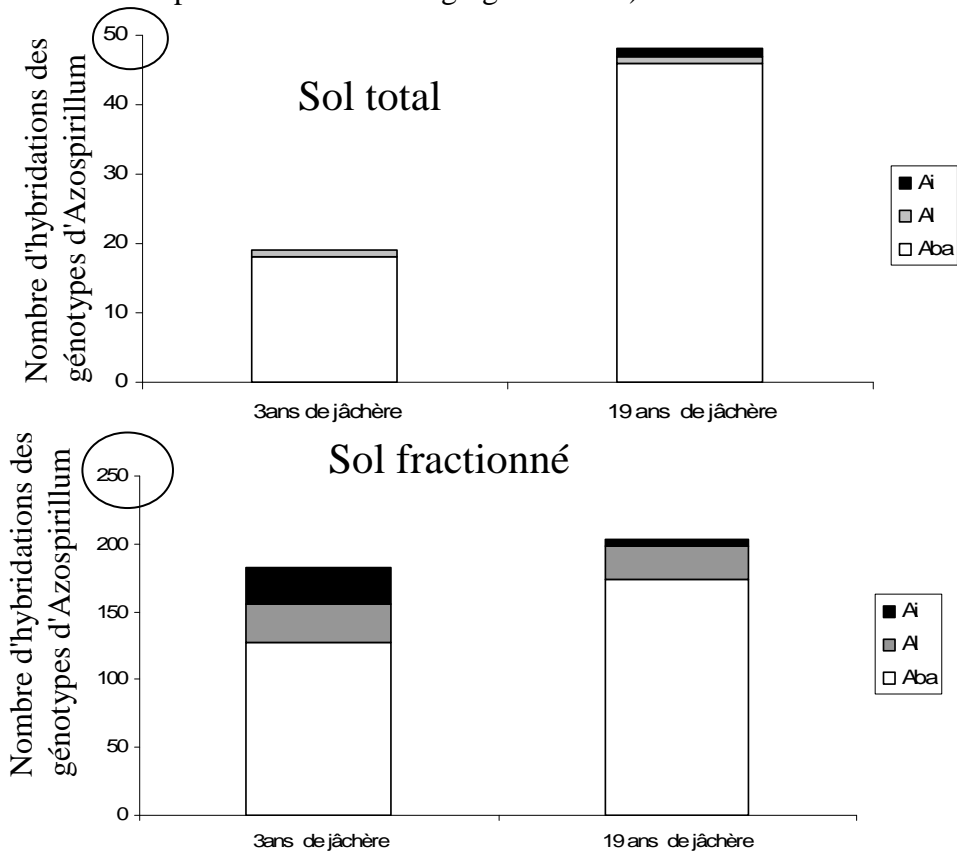
## **1.2 Echelle spatiale**

Le sol est un milieu très hétérogène, composé de nombreux microenvironnements caractérisés par différentes concentrations en substrats, en oxygène, en eau, et d'autres caractéristiques comme le pH. A l'échelle micro- et millimétrique, selon Hattori (1988) et Oades et Waters (1991), la structure du sol et son hétérogénéité peuvent être décrites par une





**Figure 9:** Représentation schématique de la structuration en micro-environnements d'un sol (d'après Nazaret et al. 1999). On peut distinguer les bactéries de la fraction externe (situées dans la macroporosité, dans les agrégats instables et à la surface des agrégats stables) et les bactéries de la fraction interne (situées dans la microporosité et dans les agrégats stables)

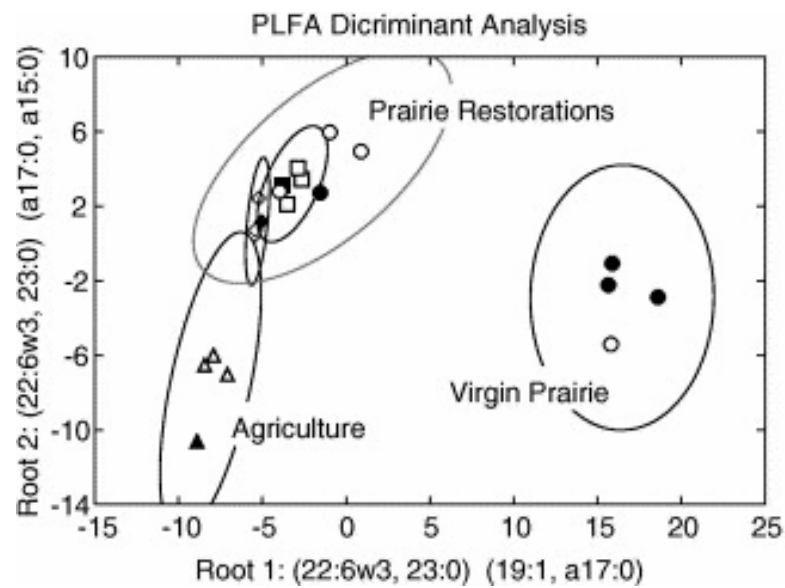


**Figure 10:** Abondance de 3 génotypes d'*Azospirillum* détectés dans des sols sous jachère depuis 3 ou 19 ans (haut) à partir du sol total ou (bas) par analyses des différentes fractions du même sol (on donne dans ce cas-là la somme des valeurs obtenues pour plusieurs fractions). D'après Chotte et al. 2002. Ai: *A. irakense* ; Al: *A. lipoferum* ; Aba: *A. brasilense/A. amazonense*

approche physique basée sur un fractionnement granulométrique et densimétrique. Les agrégats peuvent être classifiés selon leur taille et leur stabilité : des macroagrégats d'un diamètre supérieur à 250  $\mu\text{m}$  plutôt instables (fraction externe) et des microagrégats inférieurs à 250  $\mu\text{m}$  et généralement beaucoup plus stables (fraction interne) (Fig. 9).

En fonction de leur localisation, les communautés bactériennes pourront être affectées différemment par les changements de modes de gestion des terres. A l'intérieur des agrégats les communautés microbiennes seront plus protégées des fluctuations environnementales engendrées par les changements de gestion, alors qu'à l'extérieur des agrégats, les communautés seront plus soumises à ces fluctuations environnementales. La réponse des communautés microbiennes observée à l'échelle décimétrique à métrique (carotte de sol par exemple) n'est donc pas forcément représentative des processus se déroulant à micro-échelle. Illustrant l'intérêt de la prise en compte de la microlocalisation des communautés bactériennes, Chotte et al. (2002) ont observé une diversité de souches d'*Azospirillum* dans le sol fractionné qui n'apparaissait pas s'ils analysaient le sol total non fractionné (Fig. 10). Dans le sol total, 3 génotypes sont détectés pour les sols sous jachère depuis 19 ans (contre 2 dans la jachère de 3ans) alors que les 3 génotypes sont bien représentés dans les fractions du sol sous jachère récente.

Cependant la grande majorité des études d'écologie microbienne a porté sur le sol total (homogénéisé par tamisage), et les quelques études ayant pris en compte la spatialisation des bactéries n'ont pas été réalisées dans des contextes de changements de mode de gestion des terres (celle de Chotte et al., 2002 a été réalisée dans le cadre d'un arrêt de la culture mais sans référence à des systèmes cultivés et non cultivés). Pourtant, la microlocalisation peut influencer parfois fortement la réponse des bactéries après des changements de gestion, et plus généralement après des perturbations. Par exemple, Ranjard et al. (1997), Chenu et al. (2001) et Ranjard et Richaume (2001) ont pu observer un effet plus prononcé d'apports de mercure et de glucose sur les bactéries de la fraction externe, plus exposées à ces changements de conditions environnementales. Mummey et al. (2006) suggèrent que les microagrégats correspondent à des microenvironnements sélectionnant certains grands groupes bactériens. Bien que ces approches prenant en compte la microlocalisation bactérienne puissent permettre d'améliorer notre compréhension de la réponse des communautés bactériennes après changements des mode gestion des écosystèmes, la mise en œuvre de ces expérimentations demeure relativement lourde et ne peut être appliquée systématiquement. Ces contraintes techniques sont probablement à l'origine du très faible



**Figure 11:** Analyse en Composantes Principales de la structure de la communauté bactérienne (PLFA) de sols de prairie restaurées, de prairies natives et de sols agricoles. Les ellipses représentent des niveaux de confiance de 80%. D'après McKinley et al. (2005).

nombre d'études explicitant le rôle de la localisation des bactéries dans le contexte des changements de mode de gestion.

## **2. Conception du plan expérimental**

Quand une communauté bactérienne subit un changement de gestion (passage d'une gestion A à une gestion B), elle peut atteindre différents états, plus ou moins dépendants des effets des modes de gestion actuelle B et passée A. C'est pourquoi, il est important dans ce type d'étude de pouvoir caractériser l'état des communautés bactériennes du sol dans des systèmes « contrôles » soumis depuis longtemps à la gestion A d'une part et à la gestion B d'autre part, dans des conditions (climatiques, pédologiques, géographiques) au maximum comparables. Par exemple, on peut citer les études de Buckley et Schmidt (2001) et McKinley et al. (2005) qui ont pu décrire la structure de la communauté microbienne de sols de prairies en cours de restauration, et observer que la structure de la communauté reste différente de celle des communautés des sols prairiaux et des sols cultivés contrôles (Fig. 11). A l'inverse, l'étude de Singh et al. (2007) a montré que la communauté des méthanotrophes après reforestation était différente de celle présente dans les sols agricoles, mais l'étude n'analysant pas de sols de forêt, il n'est pas possible de savoir si la structure de la communauté devient similaire à celle des communautés de sols de forêt native.

Les écosystèmes sont fréquemment soumis à des changements de gestion vers l'extensification mais également vers l'intensification. Il est donc intéressant de concevoir un plan expérimental intégrant des changements réciproques des modes de gestion, c'est-à-dire étudiant simultanément le changement gestion A vers gestion B et gestion B vers gestion A. Ceci reste cependant relativement rare : l'on peut citer les études de Garbeva et al. (2006), Salles et al. (2006a,b) réalisées toutes trois dans un même contexte d'arrêt et mise en culture aux Pays-Bas, et l'étude de Pankhurst et al. (2002) concernant l'application du labour sur des sols non labourés et la réciproque, l'arrêt du labour sur des sols initialement labourés en Australie.

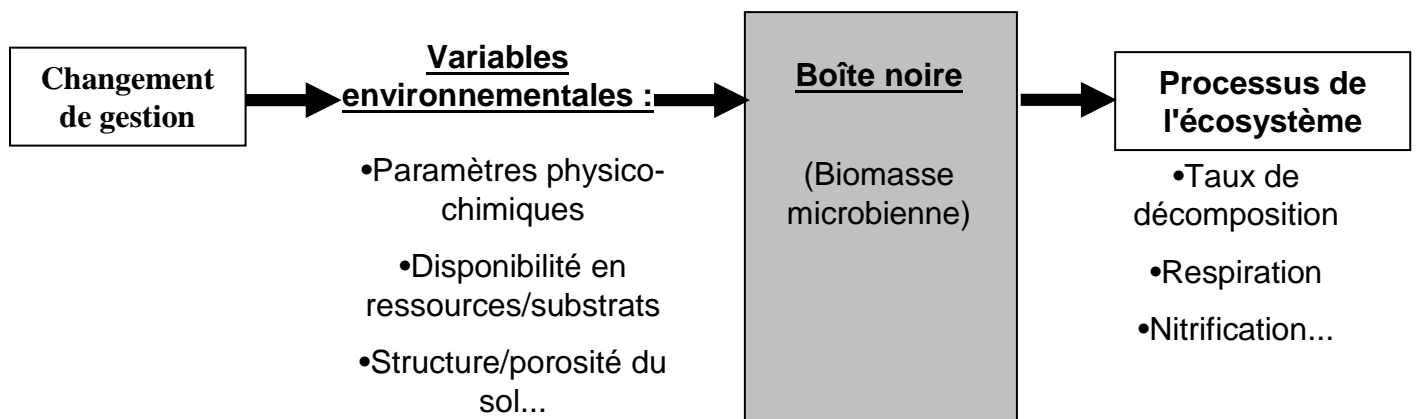
## **3. Intérêt d'analyser la réponse de différents groupes fonctionnels bactériens pour l'étude des effets des changements de mode de gestion**

Les communautés bactériennes du sol peuvent être classifiées en groupes fonctionnels : ensembles d'espèces réalisant une même fonction. Par exemple, on peut définir



les bactéries cellulolytiques, nitrifiantes, méthanogènes, etc. Ces groupes fonctionnels peuvent réaliser des fonctions plus ou moins spécialisées au sein du système sol : ainsi, la nitrification correspond à une fonction spécialisée (oxydation du  $\text{NH}_4^+$  en  $\text{NO}_2^-$  et  $\text{NO}_3^-$ ) alors que la décomposition de matière organique est une fonction « large » englobant de nombreux processus (dégradation de la cellulose, de la lignine...eux-mêmes recouvrant différents fonctionnements. Leurs niveaux de diversité taxonomique, leur abondance, leurs exigences écologiques peuvent également être très différents. En lien avec ces caractéristiques, la réponse à un changement de mode de gestion des terres pourra donc être radicalement différente selon le groupe fonctionnel étudié. Plus précisément, selon Schimel (1995), on peut attendre un lien plus fort entre la composition et le fonctionnement d'un groupe fonctionnel réalisant une fonction très précise (par exemple activité et diversité des nitrifiants) que dans le cas d'une fonction plus largement répandue (décomposition ou flux de  $\text{CO}_2$  et structure de la communauté bactérienne).

Au sein d'un même cycle biogéochimique, les caractéristiques contrastées entre différents groupes fonctionnels participant à ce cycle peuvent également expliquer des réponses différentes de ces communautés face à des changements de mode de gestion. Par exemple, Avrahami et al. (2003) ont observé qu'un apport d'azote sur un sol agricole a entraîné une modification conjointe de la structure génétique et de l'activité de la communauté dénitrifiante, alors que seule l'activité des nitrifiants (*Ammonium Oxidizing Bacteria*) a été modifiée sans effet sur la structure génétique de cette communauté. Selon les auteurs, cette différence serait due au taux de croissance plus rapide des dénitrifiants qui leur aurait conféré la capacité de réagir plus rapidement que les nitrifiants (à croissance plus lente). Le fait que différentes communautés participant à un même cycle biogéochimique puissent ainsi répondre différemment peut expliquer des modifications notables de ce cycle : par exemple, si la nitrification est réduite alors que la dénitrification est accrue, ceci tendrait à diminuer la disponibilité en nitrate dans le sol. Malgré l'importance qu'il y a donc à analyser la réponse de différentes communautés impliquées dans un même cycle biogéochimique face à des changements de mode de gestion, la plupart des études dans la littérature se focalisent sur une seule communauté.



**Figure 12:** Schématisation de la manière dont beaucoup d'études travaillent sur la réponse du système sol à des changements de mode de gestion et représentent la communauté bactérienne comme une boîte noire.

#### **4. Transferts de sols entre écosystèmes: des études intéressantes dans le contexte de l'analyse des effets des changements de mode de gestion**

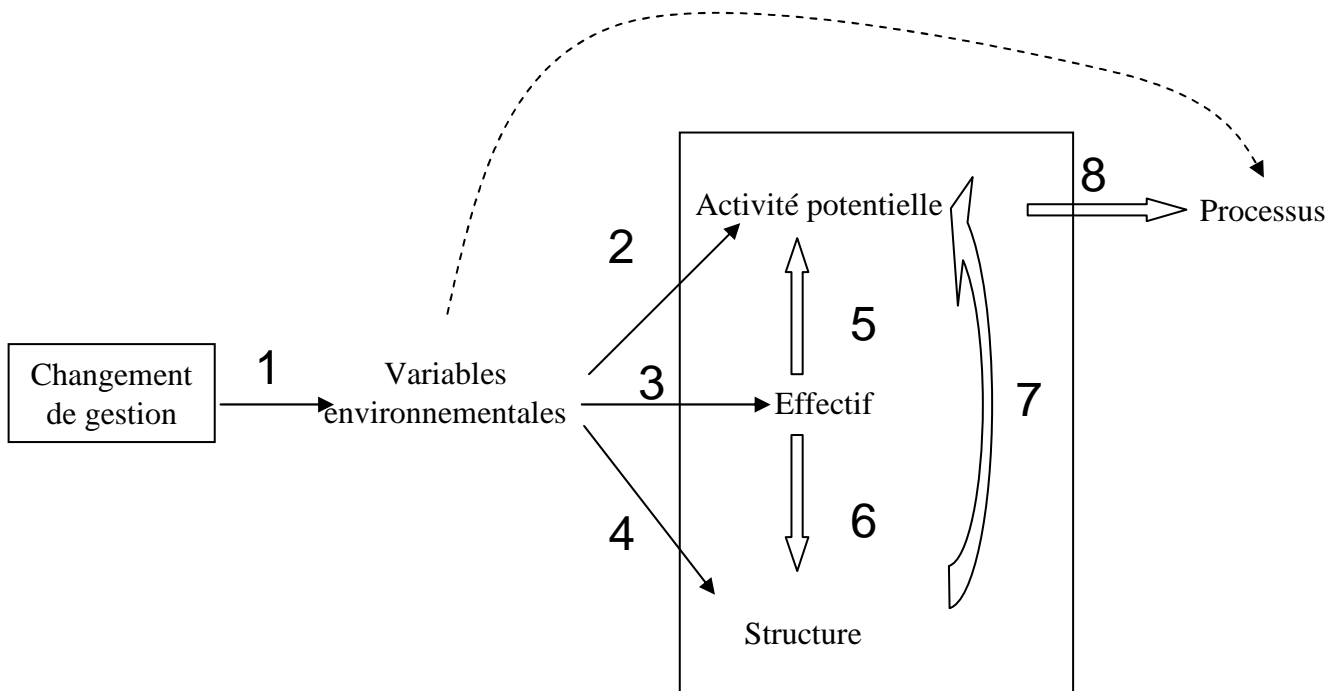
Bien qu'il ne s'agisse pas *sensu stricto* d'un changement de mode de gestion, le transfert de carottes de sol d'un contexte écosystémique vers un autre peut apporter d'intéressantes informations sur la réponse des communautés bactériennes soumises à de tels changements environnementaux. Nous avons trouvé cinq études qui ont été réalisées après transfert de carottes de sols de prairie en forêt et *vice et versa* (Balser et Firestone, 2005 ; Bottomley et al., 2004; Bottomley et al., 2006; Boyle et al., 2006 et Waldrop et Firestone, 2006) en travaillant sur des communautés fonctionnelles et sur toutes leurs composantes (activité, effectif et diversité). Ces études ont été conduites en dynamique et en prenant en compte des variables environnementales pertinentes (par exemple, pour la communauté dénitrifiante : N minéral, humidité, respiration). Les activités et les effectifs des communautés nitrifiante, dénitrifiante et bactérienne ont été affectées par les 2 types de transferts mais plus fortement dans le cas du transfert de sol de forêt vers prairie. La comparaison de ces deux systèmes a permis de démontrer la forte influence des variables environnementales du nouveau contexte environnemental sur les communautés bactériennes transplantées.

#### **5. Représentation de la composante microbienne dans les études analysant les effets des changements de mode de gestion**

Durant les 3 dernières décennies, l'étude des cycles biogéochimiques dans les écosystèmes terrestres s'est principalement focalisée sur les processus réalisés par les microorganismes. Par contre, l'analyse et la compréhension des populations microbiennes responsables de ces processus a été souvent négligée, considérant la communauté bactérienne uniquement comme une « boîte noire » (Tiedje et al., 1999) (Fig. 12).

Pourtant ces processus écosystémiques sont sous l'influence de l'activité des microorganismes, elle-même dépendant de facteurs environnementaux. En effet, soumise à des perturbations et notamment à des changements de gestion, l'activité des communautés microbiennes peut être modifiée de 3 manières non exclusives. Une modification de l'activité bactérienne peut résulter (i) d'un changement de l'activité physiologique des bactéries, quantification en terme d'activité par cellule, (ii) d'un changement d'effectif bactérien, et (iii) d'un changement dans la composition de la communauté.





**Figure 13** : Schéma illustrant comment la boîte noire de la figure 11 peut être "ouverte" en considérant les différentes composantes de la communauté bactérienne. La signification de chaque flèche numérotée est donnée dans le texte. La flèche en pointillés souligne que l'activité réelle d'une communauté bactérienne dépend de son activité potentielle et des variables environnementales permettant à ce potentiel de l'exprimer plus ou moins.

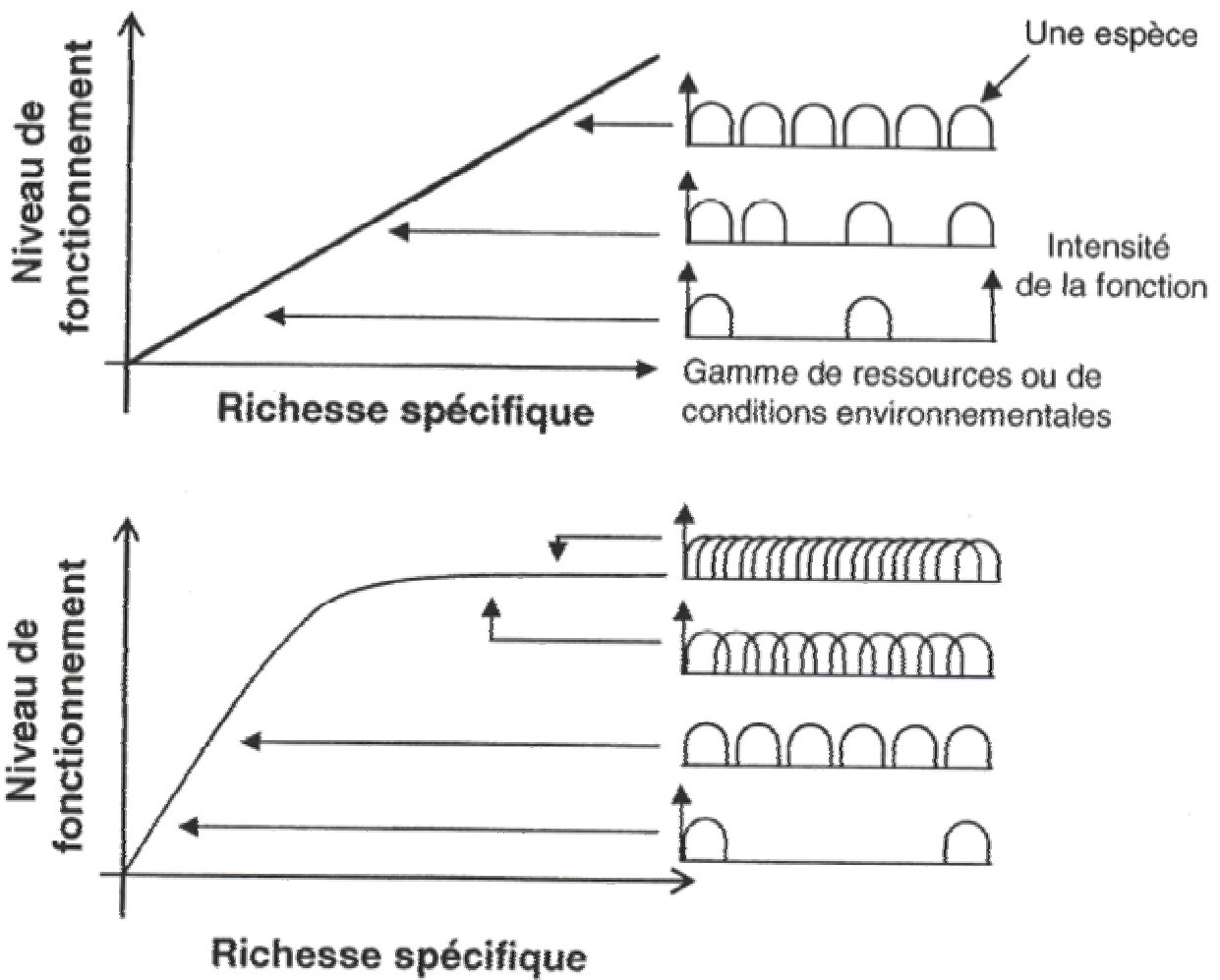
Plus précisément, on peut représenter les différentes « voies » permettant d'expliquer l'effet des changements de mode de gestion sur le niveau d'activité d'une communauté bactérienne (Fig. 13 d'après les schémas conceptuels de Balser et al. (2006) et Mosier et al. (1997). Ainsi, le changement de mode de gestion va engendrer des modifications des variables environnementales, par exemple les conditions physico-chimiques (modifications des concentrations en gaz, en pH...) et/ou la disponibilité en ressources et substrats (substrats carbonés, azotés, ...) (flèche n°1 de la Fig. 13).

*Sur le court terme*, ces changements de variables environnementales peuvent affecter en premier le niveau de l'activité physiologique des bactéries *via* les phénomènes d'induction-transcription et synthèse protéique (flèche n°2 de la Fig. 13). En effet, de nombreuses activités bactériennes, notamment celles retrouvées dans le cycle de l'azote, sont inductibles : la synthèse des enzymes clés ne se réalise que dans certaines conditions. Par exemple, une communauté présente en effectif important mais dans des conditions ne permettant pas l'induction des enzymes, ne réalisera pas un niveau d'activité élevé. Activité et effectif d'une communauté bactérienne donnée peuvent donc être plus ou moins découplés.

*Sur le court et le moyen termes*, les modifications des variables environnementales peuvent également agir sur les effectifs bactériens (flèche n°3 de la Fig. 13). Par conséquent, l'activité bactérienne pourra en être augmentée ou diminuée (flèche n°5).

*A moyen et long termes*, la structure de la communauté bactérienne pourra être modifiée (Mosier et al., 1997). Les conditions environnementales ayant changé, certaines populations vont pouvoir se développer dans ces nouvelles conditions plus favorables pour elles et cela, aux dépens d'autres populations initialement dominantes (flèche n°4 de la Fig. 13). Cette modification de structure pourra engendrer une modification de l'activité (flèche n°7). En effet, bien que plusieurs populations bactériennes d'un groupe fonctionnel donné réalisent la même fonction, leurs caractéristiques physiologiques peuvent leur conférer un niveau d'activité différent. A l'inverse, il est également possible d'observer un changement de la structure de la communauté bactérienne sans modification du niveau d'activité. Ceci correspond au concept de redondance fonctionnelle où différentes populations ont la capacité de réaliser une fonction de façon similaire (Fig. 14 d'après Peterson et al., 1998).

En conclusion, un changement de gestion pourra affecter les activités bactériennes par trois mécanismes non exclusifs : une modification de l'activité par cellule, une modification des effectifs et une modification de la composition des communautés bactériennes. Comprendre les effets des changements de mode de gestion passe donc par la caractérisation



**Figure 14:** Représentation schématique de situation de faible (haut) et forte (bas) redondance fonctionnelle entre populations d'un écosystème. Pour chaque dôme la hauteur représente l'intensité de la fonction assurée par une population et la largeur représente la gamme d'utilisation des ressources utilisées par cette population ou des conditions environnementales dans lesquelles la fonction peut-être réalisée par cette population. Ce schéma peut s'appliquer pour des populations appartenant à différents groupes fonctionnels ou appartenant toutes à un groupe fonctionnel donné. Modifiée d'après Peterson et al. (1998)

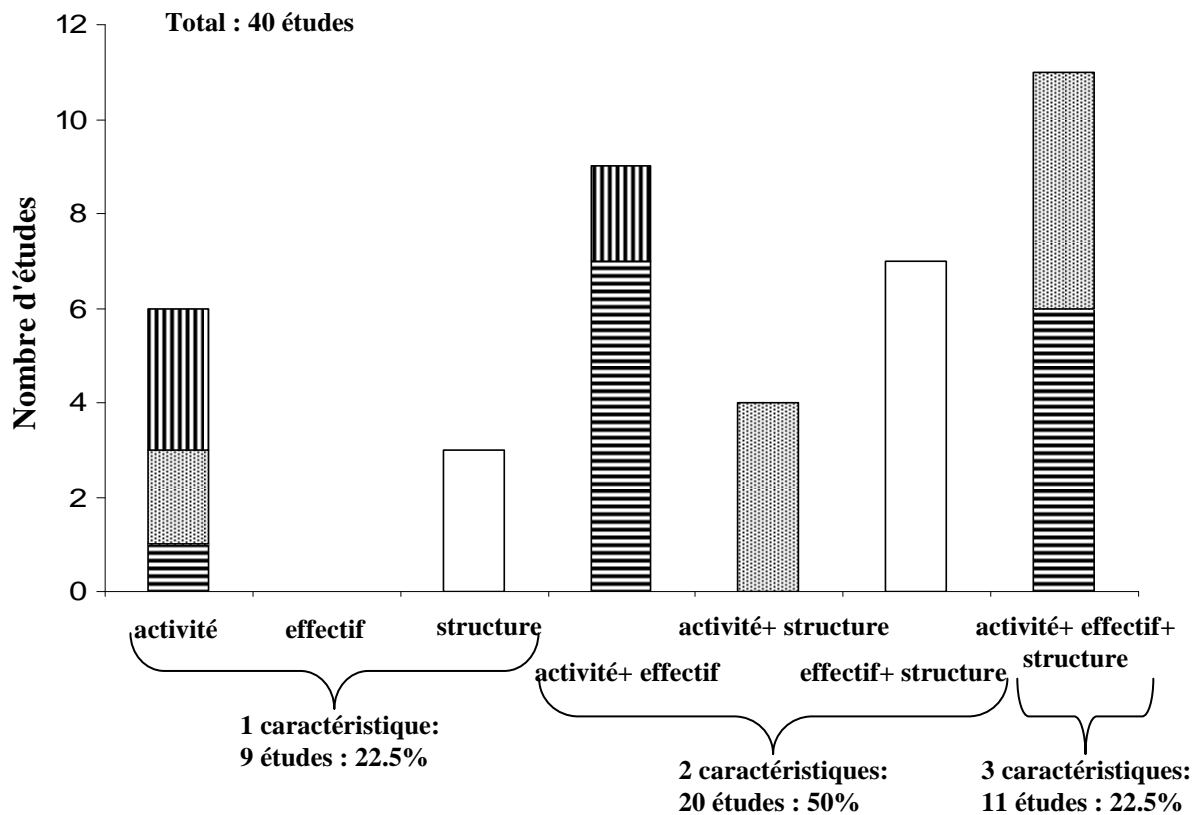
des différentes caractéristiques d'une communauté bactérienne et des variables environnementales pertinentes de ces différentes caractéristiques. Mais, pour des raisons qui seront explicitées et détaillées dans la section suivante, la majorité des études portant sur les effets des changements de mode de gestion sur les communautés bactériennes s'est attachée à caractériser tout au plus 2 caractéristiques (Fig. 15). Très peu d'études ont pris en compte les modifications conjointes des trois caractéristiques d'un groupe fonctionnel bactérien.

## **6. Intérêts et limites de la prise en compte des différentes caractéristiques (activité, effectif, diversité) des communautés bactériennes**

### **6.1. Prise en compte d'une seule caractéristique**




Parmi les 6 études ayant caractérisé une seule caractéristique des communautés bactériennes étudiées (Fig. 15), trois ( Clegg et al., 2003 ; Freitag et al., 2005; Nicol et al., 2007) ont porté sur la structure génétique d'un ou plusieurs groupes bactériens, toutes parues dans des journaux spécialisés en écologie microbienne. Ces 3 études ont insisté sur la nécessité de mieux connaître la composition des communautés bactériennes présentes dans des sols soumis à des changements de mode de gestion (modification du niveau de fertilisation pour Freitag et al., 2005 et Clegg et al., 2003, reforestation d'anciennes cultures pour Nicol et al., 2007). Par exemple, dans un contexte de reforestation, Nicol et al. (2007) ont déterminé la structure de la communauté encore fort méconnue des archéobactéries et retrouvé certains groupes précédemment identifiés dans d'autres types de forêts.

Dans ces 3 études, les différents changements de gestion (respectivement, la reforestation, le niveau de fertilisation) ont causé des changements de la structure des communautés bactériennes étudiées (archéobactéries pour Nicol et al., 2007, NOB pour Freitag et al., 2005 et eubactéries, actinobactéries, AOB et pseudomonads pour Clegg et al., 2003). Cependant, l'objectif de ces études n'a pas été d'établir un lien entre les éventuels changements de structure des communautés et les changements de fonctions remplies par celles-ci. La conclusion de ces études met en relief d'ailleurs cette absence de lien structure/fonctionnement, en le positionnant, pour Clegg et al. (2003), en perspective de travaux futurs. Le point commun a été d'appliquer des techniques de biologie moléculaire relativement novatrices (par exemple, première étude de la communauté des bactéries nitrifiantes du sol via leurs séquences 16S pour Freitag et al. (2005) .



**Figure 15:** Répartition des 36 études sur l'effet des changements de mode de gestion sur des communautés bactériennes que nous avons analysées en fonction des caractéristiques de la communauté bactérienne cible qu'elles ont prises en compte. Nous avons distingué des études ayant caractérisé des activités potentielles, des flux bruts ou d'autres types d'activité (activités nettes...).

#### Type d'activité mesurée

-  : Flux bruts
-  : Activités enzymatiques
-  : Autres mesures d'activité

Concernant les autres études ayant mesuré une seule caractéristique de la communauté bactérienne, trois d'entre elles ont porté sur la réponse d'une activité bactérienne (respectivement oxydation du CH<sub>4</sub>, minéralisation de l'azote et du carbone (SIR, substrate-induced respiration) (Prieme et al., 1997 ; Antil et al., 2001; Nakamoto et al., 2006) et trois autres ont porté sur la réponse du flux brut de minéralisation d'azote (Accoe et al., 2004; Ambus, 2005; Burton et al., 2007). Toutes ont été publiées dans des revues de sciences du sol. Ici, l'objectif principal était de déterminer les différences de fonctionnement de l'écosystème sol en fonction de changements de gestion (respectivement, reforestation, changements du niveau de fertilisation et réduction du labour), en suivant des changements d'activités bactériennes et de variables environnementales. Ainsi, l'étude de Prieme et al. (1997) a permis d'observer une augmentation très lente de l'oxydation du CH<sub>4</sub> en fonction du nombre d'années après reforestation. Cette augmentation lente a sans doute été liée à la mise en place progressive de conditions environnementales favorables à la réalisation de cette activité mais résulte peut être également de la nécessité (i) d'un changement préalable de la composition de la communauté méthanotrophe et de la croissance des populations réalisant un fort niveau d'oxydation du CH<sub>4</sub> dans les nouvelles conditions environnementales ou (ii) d'une augmentation significative des effectifs des bactéries méthanotrophes. Antil et al. (2001) et Nakamoto et al. (2006) ont observé des effets des changements de labour et de fertilisation appliqués à des sols cultivés sur 2 activités, la respiration et la minéralisation de l'azote, en lien avec les pools d'azote et de carbone dans le sol. Ces 3 études avaient toutes pour objectif de caractériser des changements d'activité bactérienne sans essayer de les expliquer par les caractéristiques physiologiques, les effectifs ou la structure des communautés bactériennes assurant ces activités.

Les études ayant porté sur l'analyse d'une seule caractéristique des communautés bactériennes du sol dans un contexte de changement de mode de gestion peuvent être scindées en 2 classes selon leur problématique:

(i) Savoir qui est là ? c'est-à-dire caractériser les structures des communautés, identifier les bactéries présentes.

(ii) Analyser comment le sol fonctionne c'est-à-dire étudier les effets des changements de gestion sur certaines activités bactériennes.

Les premières études sont situées dans le champ de l'écologie microbienne du sol et les secondes dans celui de l'écologie des écosystèmes ou des sciences du sol. Dans les 2 cas, si une seule caractéristique a été étudiée, cela provient davantage de la manière d'aborder la



problématique plutôt que d'un problème de disponibilité d'outils techniques, puisque des outils de biologie moléculaire novateurs ont fréquemment été utilisés sans faire de liens avec des mesures d'activités bactériennes dont les outils sont souvent faciles à mettre en œuvre.

## **6.2 Prise en compte de 2 caractéristiques des communautés bactériennes**

### **6.2.1 Activité et effectif des communautés bactériennes**

Sur les 40 études que nous avons analysées, 9 ont pris en compte conjointement l'activité et l'effectif d'une même communauté (Fig. 15). Lorsque l'on étudie l'effectif d'une communauté conjointement à l'activité (le plus souvent des activités enzymatiques) de cette communauté dans un contexte de changements de mode de gestion, la problématique reste sensiblement la même que dans les études ayant porté sur une mesure d'activité : caractériser les effets des changements de mode de gestion sur le fonctionnement du sol et les effectifs bactériens. En effet, la mesure d'effectif est généralement exploitée pour décrire globalement les effets du changement de gestion sur le système sol, les auteurs présentant parfois les mesures d'activité et d'effectif comme des mesures de « propriétés microbiologiques du sol ». Les données sur les effectifs restent donc peu utilisées pour expliquer les changements d'activités. D'ailleurs, ces études ont souvent porté sur des variables assez globales, c'est-à-dire pour les effectifs sur des mesures de biomasse bactérienne et pour l'activité sur des mesures de respiration ou d'activités enzymatiques de type glucosidase (Lovell et al., 1995; Chen et al., 2000; Wick et al., 2000; Chapman et al., 2003; Raiesi, 2007). Deux parmi les 9 études, ont porté sur l'analyse de la réponse du flux brut de minéralisation de l'azote et de la biomasse microbienne après un processus de réhabilitation de sols miniers et des changements du niveau de fertilisation (Banning et al., 2008 ; Hatch et al., 2000).

On constate que le lien entre activité et effectif n'est donc pas considéré comme primordial dans ces études, notamment dans celle de Templer et al. (2005) sur les effets de la reforestation. La respiration et la biomasse microbienne totale sont étudiées, mais lorsqu'une fonction plus précise a été ciblée, par exemple la dénitrification, les effectifs correspondants ne sont pas mesurés. Seule l'étude de Maly et al. (2000) a ciblé en parallèle une fonction précise (nitrification) et les effectifs de la communauté nitrifiante. Cela leur a permis de conclure que 2 années d'abandon de l'agriculture pour y installer des espaces en jachère n'ont pas eu d'effet sur les effectifs et l'activité de la communauté bactérienne mais la baisse des





effectifs et de l'activité de la communauté nitrifiante leur a laissé supposer que ce changement de gestion n'était pas sans conséquence sur le cycle de l'azote.

Ce type d'études sur les effectifs et les activités bactériennes face à des changements de gestion conserve donc souvent la démarche d'étude décrite précédemment : caractériser les effets de changements de gestion sur le fonctionnement de l'écosystème sol via des mesures d'activités, les données sur les effectifs n'étant pas exploitées pour expliquer les changements d'activités.

### **6.2.2 Structure et effectif des communautés bactériennes**

Dans les 40 études que nous avons analysées, 7 prennent en compte à la fois la structure et les effectifs bactériens (Fig. 15). Quatre études analysent soit la quantité et diversité des bactéries via les séquences du gène 16S (Buckley et Schmidt, 2001, 2003), soit la quantité et la structure de la communauté microbienne (via l'analyse des PLFA) (Zeller et al., 2001; McKinley et al., 2005). Dans ces études, l'attention a été plus portée vers la caractérisation de la structure que vers celle des effectifs des communautés bactériennes. Majoritairement, ces études ont porté sur la communauté bactérienne ou microbienne, à l'exception de celle de Salles et al. (2006a) qui a porté sur la communauté des *Burkholderia*.

Au total les 7 études trouvées peuvent être séparées en 2 groupes, selon l'exploitation qui est faite des données d'effectifs bactériens. Trois d'entre elles avaient pour but essentiel de caractériser la structure des communautés présentes après des changements de gestion. Ces études ont caractérisé l'abondance relative de différents grands groupes bactériens (Buckley and Schmidt, 2001, 2003) pour compléter les données de structure de communauté. Salles et al. (2006b) ont eux observé des effectifs de *Burkholderia* différents selon le changement de gestion et selon l'environnement (sol rhizosphérique ou total). Mais surtout, ce comptage sur boîtes avait pour but de sélectionner les bactéries *Burkholderia* cultivables en vue de l'étude de la composition de cette communauté. Concernant, les 4 autres études (Zeller et al., 2001; Gomez et al., 2004; McKinley et al., 2005; Clegg, 2006), leur but a été non seulement de déterminer les effets des changements de mode de gestion sur ces variables bactériennes (structure, effectif) mais également de voir leurs liens avec certaines variables environnementales. Toutes 4 sont parues dans des revues d'écologie des écosystèmes ou de sciences du sol. Par exemple, pour Clegg (2006) les données sur les effectifs ont été traitées indépendamment des données de structure bactérienne : il a étudié les effets du changements



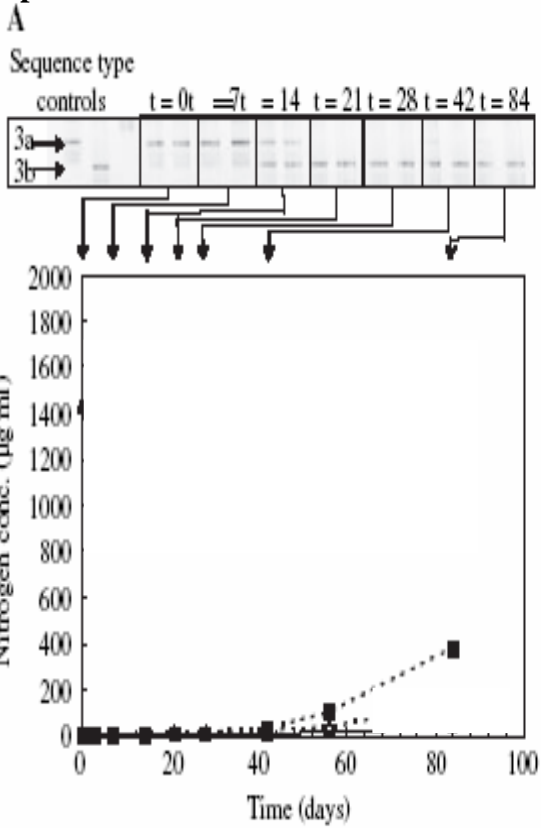
de gestion d'une part sur les effectifs bactériens et d'autre part sur les structures des communautés bactériennes sans faire de lien entre les 2. Enfin, on peut citer l'étude de Gomez et al. (2004) qui observent de multiples corrélations entre la diversité bactérienne et des variables environnementales telles que les caractéristiques d'agrégation du sol, la quantité de matière organique et le pool d'azote minéral.

Dans les études prenant en compte à la fois les effectifs et la structure des communautés bactériennes, la mesure d'effectif est souvent considérée comme une information annexe puisqu'elle ne peut être utilisée pour comprendre les changements de structure de la communauté bactérienne et que les activités bactériennes pouvant dépendre de ces effectifs ne sont pas étudiées ici.

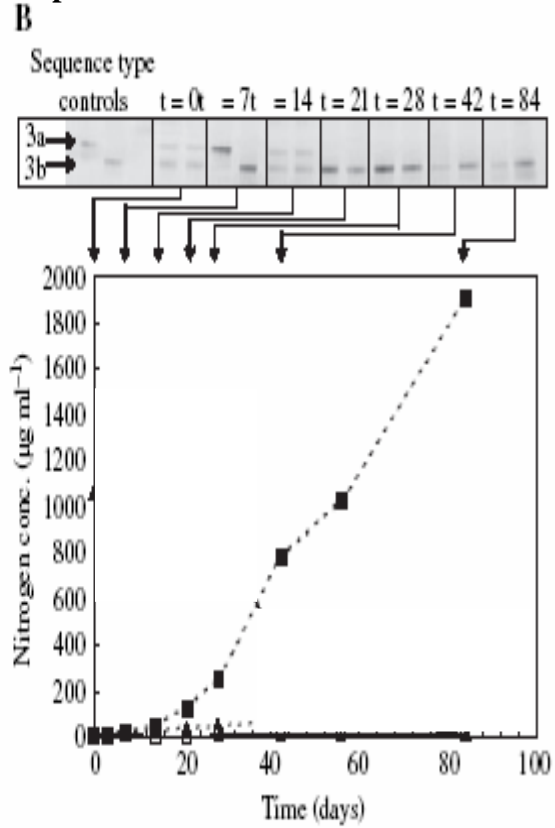
### **6.2.3 Structure et activité des communautés bactériennes**

Les études (au nombre de 4 parmi les 40 analysées) ayant porté sur la structure et l'activité d'une communauté bactérienne ont mesuré des activités nettes, plutôt que des activités enzymatiques. L'objectif recherché est dans ce cas de déterminer les relations entre les changements de la structure bactérienne et l'expression des processus dans le sol (Fig. 13, flèche n°7). Par rapport aux études citées dans le paragraphe précédent, ces études ont choisi de porter conjointement leur attention sur la structure et l'activité et donnent donc plus d'importance aux communautés fonctionnelles. Felske et al. (2000) ont fait exception à cette approche, en travaillant sur la communauté bactérienne sans essayer de faire de lien avec les changements d'activité (estimée par le niveau d'ARN). Par contre, les 3 autres études suivent le schéma décrit. Ainsi, l'étude de Salles et al. (2006a) a permis d'observer comment répondait la structure génétique des *Burkholderia* à des changements de gestion et dans quelle mesure ces changements pouvaient affecter les capacités antagonistes de cette communauté envers les bactéries pathogènes de cultures que sont les *Ralstonia solani* AG3. Dans un contexte de reforestation, Singh et al. (2007) ont porté leur attention sur un groupe fonctionnel peu étudié malgré son rôle important dans l'écosystème, les méthanotrophes. Une lente augmentation de l'activité d'oxydation du CH<sub>4</sub> est observée au cours du processus de reforestation, de manière similaire aux résultats obtenus par Prieme et al. (1997). Cependant, ici les auteurs ont adopté une méthodologie leur permettant d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes mis en jeu. Une technique de marquage isotopique (PLFA-SIP) a été mise en œuvre afin d'analyser la structure génétique des bactéries méthanotrophes

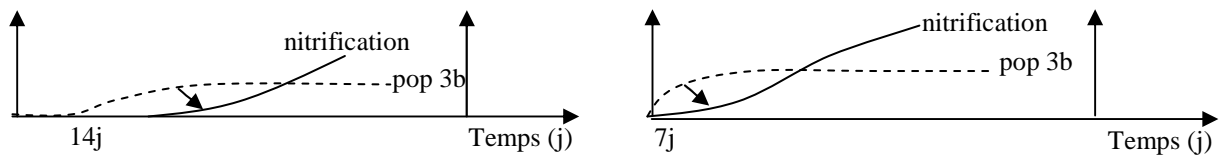
•Fertilisation de sols non fertilisés au préalable



•Fertilisation de sols fertilisés au préalable



**Interprétation:**



**Figure 16:** Effet d'un changement de fertilisation sur l'activité et la structure de la communauté nitrifiante. D'après Webster et al. 2005

actives (incorporant le  $^{13}\text{C}$ ). Les auteurs concluent que les différences de structure génétique des méthanotrophes actifs entre les sols de prairie et les sols reboisés pourraient être à l'origine des changements d'activité (cependant un changement des effectifs de méthanotrophes, non mentionnés dans cette étude, peut également expliquer une partie des différences d'activités).

Une autre étude intéressante sur les liens entre caractéristiques d'une communauté bactérienne et processus assurée par cette communauté après un changement de mode de gestion a été menée par Webster et al. (2005). L'effet d'apport d'azote sur la structure et l'activité des nitrifiants a été analysé sur des sols de prairies historiquement fertilisées ou non. Dans la prairie fréquemment fertilisée, la nitrification augmente rapidement alors qu'un délai de 35 jours est observé avant que la nitrification augmente dans les prairies non fertilisées (Fig. 16). Les auteurs interprètent ce délai par la nécessité pour la communauté nitrifiante des prairies non fertilisées d'avoir d'abord sélection d'une population particulière –séquence 3b – qui serait résistante aux fortes concentrations en azote (les populations normalement dominantes dans les sols non fertilisés étant sensibles aux fortes concentrations en azote). Cette population particulière est toujours dominante dans les sols des prairies fertilisées. Dans les sols de prairie sans passé de fertilisation, l'augmentation de la nitrification suite à une fertilisation nécessite donc d'abord un changement de la diversité de la communauté. Ces auteurs n'ont pas obtenu, au sens strict, de données sur les effectifs des nitrifiants mais, en utilisant l'intensité relative de certaines bandes DGGE, ils ont pu obtenir une information qualitative sur les effectifs de certaines populations. Bien que cette approximation de la mesure d'effectif par l'intensité des bandes puisse être controversée (puisque une bande peut cacher plusieurs populations et que l'intensité d'une bande n'est pas simplement corrélée à l'abondance des séquences), cette étude a apporté des données très intéressantes sur les modifications de l'intensité de la nitrification après des changements de fertilisation: l'augmentation de l'activité nitrifiante n'apparaît possible que si certaines populations spécifiques capables d'être actives à fortes concentrations en azote, sont présentes comme dans les sols fertilisés ou sont d'abord sélectionnées comme dans les sols non fertilisés au préalable.



En conclusion, ces études ont permis parfois d'aller vers la compréhension du rôle de la structure des communautés fonctionnelles du sol dans leur réponse aux changements de gestion. Par contre, toutes ces études ont mesuré des activités 'nettes' qui correspondent à la somme de plusieurs processus (par exemple, la minéralisation nette correspond à la différence entre la minéralisation brute et l'organisation brute, ce point sera discuté plus précisément dans le paragraphe 7). Enfin, comme le montre l'étude de Webster et al. (2005), les mesures d'effectifs peuvent également présenter un grand intérêt pour mieux définir et comprendre les mécanismes mis en jeu.

### **6.3. Caractérisation de 3 caractéristiques des communautés bactériennes**

Parmi les 40 études analysées, 11 ont pris en compte à la fois l'activité, l'effectif et la diversité des communautés ciblées. Six de celles-ci ont travaillé sur la communauté bactérienne (Bardgett et al., 1997; Williams et al., 2000; Hedlund, 2002; Pankhurst et al., 2002; Lin et al., 2004; Rooney et al., 2006) mais sans chercher de lien causal entre ces 3 caractéristiques. Généralement, ces études ont porté une attention particulière à la caractérisation des variables environnementales pour identifier des corrélations entre ces variables et les activités et les effectifs bactériens. Par contre, les relations pouvant exister entre variables environnementales et structure des communautés ne sont pas analysées.

Cinq études parmi ces 11 études sont parues dans des journaux d'écologie microbienne en ayant comme objectif général une caractérisation très précise de la structure d'une communauté bactérienne fonctionnelle (Bruns et al., 1999; Kowalchuk et al., 2000a, 2000b ; Garbeva et al., 2006) ou de la communauté bactérienne (Rooney et al., 2006) ainsi que la détermination des effets des variables environnementales et de la diversité végétale sur la structure de ces communautés. L'analyse de la structure génétique est toujours le point central de ces études, le lien entre la structure ou les effectifs avec l'activité bactérienne n'est par contre pas mis en avant. Par exemple, Kowalchuk et al. (2000) ont étudié la structure génétique des AOB en expliquant la présence de certains groupes en fonction de la disponibilité en ammonium. Dans cette même étude, les mesures d'activité et d'effectifs ont été peu mises en avant car le but des auteurs n'était pas de comprendre les changements dans l'intensité du processus de nitrification suite au changement de gestion. Par contre, Garbeva et al. (2006) ont fait ce lien entre toutes les variables mesurées : ceci leur a permis d'établir





qu'une forte activité d'antagonisme contre un pathogène (*R. solani*) était corrélée à une plus forte abondance et une plus grande diversité des communautés de *Pseudomonas* et *Bacillus*.

Enfin, une seule étude, celle de Horz et al. (2004), a mis l'accent sur l'explication des variations d'intensité d'un processus (nitrification) grâce à l'étude simultanée de 3 caractéristiques de la communauté bactérienne fonctionnelle réalisant ce processus en relation avec les variables environnementales. Cette étude ne correspond pas *sensu stricto* à un changement de gestion puisqu'il s'agit d'une simulation de l'effet de composantes du changement global. Mais, on peut utiliser cette étude dans le contexte des changements de gestion en se basant sur le fait qu'un aspect de l'étude a été d'apporter de l'azote minéral sur un sol initialement non fertilisé. L'objectif était de caractériser la réponse des bactéries nitrifiantes, c'est-à-dire oxydant l'ammonium (AOB), et de déterminer en quoi les changements de nitrification potentielle peuvent être expliqués par des changements de structure et d'abondance de la communauté des AOB. Cette démarche leur a permis de conclure que le changement de nitrification en réponse aux changements globaux était essentiellement causé par un changement de la structure de la communauté des AOB et non pas de leur abondance. Il est à noter qu'il s'agit de la seule étude ayant testé statistiquement la corrélation entre les données de structure génétique et les autres données.

En résumé, la moitié de ces études a porté sur la communauté bactérienne du sol avec pour but d'observer (i) les effets d'un changement de gestion sur plusieurs caractéristiques (structure, effectif, activité) de cette communauté, et (ii) les interactions entre ces caractéristiques bactériennes et les variables environnementales sans chercher à relier les variations d'activités avec celles d'effectif et surtout de structure. Quatre autres études, plus axées sur la vision écologie microbienne, ont eu pour but d'observer les effets d'un changement de gestion surtout sur la structure génétique, les résultats obtenus pour les effectifs et les activités n'étant que peu mis en avant. Les observations sur les variables environnementales ont servi dans ce cas à expliquer les résultats de structure génétique.

Enfin, seules 2 études, celles de Horz et al. (2004) et Garbeva et al. (2006), ont couplé les données acquises sur les caractéristiques des communautés bactériennes afin d'expliquer les changements d'un processus réalisé par ces communautés, avec en plus la prise en compte de variables environnementales pour Horz et al. (2004). Ceci montre à quel point les études caractérisant l'effet des changements de mode de gestion sur les communautés bactériennes à la fois sur le plan de leur activité, leur effectif et leur diversité sont rares. Plus encore, parmi



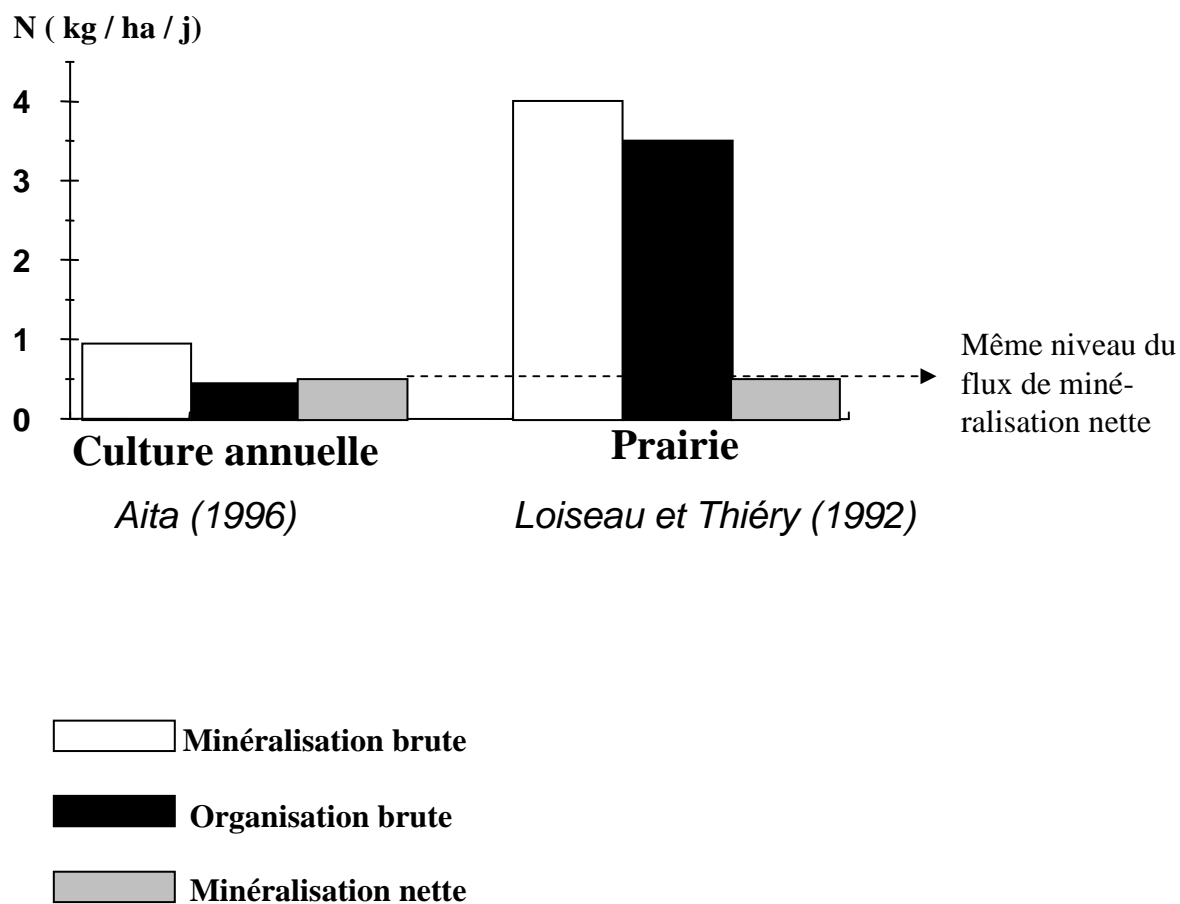
les rares études de ce type, très peu exploitent pleinement les données obtenues pour essayer de mieux comprendre les changements d'activité observés.

## **7. Intérêt de la mesure des flux bruts d'azote pour les études portant sur la réponse des communautés bactériennes du sol aux changements de mode de gestion**

L'activité des microorganismes peut être évaluée selon diverses méthodes. Tout d'abord, cette activité peut être évaluée par des émissions de gaz observées *in situ* tels que le CO<sub>2</sub>, le N<sub>2</sub>O ou le CH<sub>4</sub>. Cependant cette mesure est très dépendante des conditions climatiques (par exemple, pics de N<sub>2</sub>O après des événements pluvieux) et représente donc une grande part de réponse abiotique par rapport à la réponse biotique. Les mesures d'activité potentielle reflètent les capacités d'une communauté au moment d'un prélèvement de sol à réaliser, dans des conditions optimales, une fonction donnée (cet aspect méthodologique sera développé plus précisément dans la 2<sup>ème</sup> partie de ce chapitre). Ces mesures d'activité potentielle correspondent au final à la quantification du pool d'enzymes réalisant la fonction cible dans l'échantillon dont les variations temporelles sont plus lentes que celles des flux d'émission. Par contre, ces mesures sont réalisées dans des conditions optimales, et donc les valeurs d'activités obtenues peuvent différer significativement des valeurs d'activité réelles observées *in situ*.

Par ailleurs les flux qualifiés de « nets » d'un élément correspondent à la résultante de plusieurs processus élémentaires encore qualifiés de flux ou processus « bruts ». Les flux bruts permettent de prendre en compte le niveau effectif des différents processus se réalisant au sein du système, ce qui n'est pas le cas pour les flux nets (Fig. 17).

Dans le cas de l'azote, la **minéralisation brute** est la production d'azote ammoniacal par oxydation de composés azotés organiques. Elle est encore appelée **ammonification**. **L'organisation brute** est l'utilisation d'azote ammoniacal ou nitrique par les microorganismes du sol pour assurer leurs besoins, encore appelée **assimilation microbienne d'ammonium ou de nitrate**. La **nitrification brute** quant à elle porte le nom du processus microbien qui la détermine. Dans un sol, les processus de minéralisation brute et d'organisation brute se produisent simultanément et en sens inverse, réduisant ou augmentant le pool d'azote minéral, et le produit des deux processus constitue ce que l'on nomme la **minéralisation nette**. L'ensemble est appelé le cycle de minéralisation-organisation ou MIT en anglais (Mineralization-Immobilization Turnover).



**Figure 17:** Illustration de la caractérisation des flux bruts par rapport aux flux nets. La figure montre comment une même valeur de minéralisation nette observée ici entre un sol sous culture annuelle et un sol sous prairie, peut "cacher" des flux bruts de minéralisation et d'organisation très différents

Un exemple est donné dans la figure 17 pour comparer l'intensité de ces flux bruts et nets dans les sols sous prairie et en grande culture. L'ordre de grandeur de la minéralisation nette sous prairie et culture est similaire alors que les vitesses de minéralisation brute et l'organisation brute sont 4 à 7 fois supérieures en prairie, en raison de l'intensité du recyclage des composés carbonés et de l'activité microbienne hétérotrophe associée. On comprend donc que la seule mesure de la minéralisation nette risque de ne pas renseigner correctement sur l'intensité des processus microbiens sous-jacents. On comprend aussi que les perturbations d'un système sol (par exemple la réduction de l'entrée de carbone liée à un changement de mode de gestion) peuvent bouleverser les flux bruts élémentaires (liés aux niveaux effectifs des processus microbiens) sans forcément affecter le flux net résultant.

Malgré leurs intérêts, les techniques permettant de mesurer les flux bruts sont encore peu utilisées dans les études d'écologie microbienne. La lourdeur de leur mise en œuvre et du traitement des données, alliée au « fossé culturel » existant entre la plupart des études d'écologie microbienne et des études portant sur le fonctionnement des écosystèmes sol explique le peu de données disponibles. En effet, ces techniques ont déjà été utilisées dans le contexte des effets des modes de gestion mais toujours sans tentative de les relier avec les caractéristiques des communautés microbiennes impliquées et (ii) dans quelques études ayant caractérisé plus finement le compartiment bactérien mais toujours hors du contexte de l'étude des effets des changements de mode de gestion.

La caractérisation des flux bruts d'azote a été faite dans différents contextes, pour notamment pour étudier les effets des apports de résidus de végétaux (Recous et al., 1999; Trinsoutrot et al., 2000; Shindo and Nishio, 2005), d'apport d'azote (Ledgard et al., 1998), de la culture de blé (Bedard-Haughn et al., 2006). D'autres auteurs ont étudié les liens entre ces flux bruts d'azote et des variables microbiennes telles que la biomasse, la respiration (Zaman and Chang, 2004; Mishra et al., 2005 ; Luxhoi et al., 2008) ou les liens avec la communauté microbienne cultivable (Silva et al., 2005). Concernant les variables qui peuvent contrôler ces flux, (Booth et al., 2005) ont réalisé une méta-analyse de nombreuses études dans divers écosystèmes sol. Les principales conclusions de cette méta-analyse sont les suivantes : (i) le flux brut de minéralisation est positivement corrélé aux concentrations en C et N du sol et à la biomasse microbienne totale (ii) la nitrification brute est généralement fortement corrélée à la minéralisation brute car la production d'azote ammoniacal est généralement le facteur limitant de la nitrification (en d'autres termes la vitesse de minéralisation brute est inférieure à celle de nitrification brute potentielle dans la plupart des sols).



Six études ont mesuré les flux bruts dans un contexte de changements de mode de gestion : l'implantation de prairie pour Accoe et al. (2004), la réhabilitation de sols miniers pour Banning et al. (2008), l'implantation de production forestière pour Burton et al. (2007) et le changement du niveau de fertilisation pour Hatch et al. (2000), Hatch et al. (2002) et Ambus (2005). Leur but était de déterminer les différences de flux bruts de minéralisation et d'organisation de l'azote après les changements de gestion mais sans faire de lien avec des caractéristiques de la communauté bactérienne.

Quelques études publiées dans des revues d'écologie microbienne ont utilisé cette méthode pour caractériser les flux bruts de minéralisation et de nitrification en parallèle de la caractérisation des communautés nitrifiantes. Ainsi, l'étude de Briones et al. (2002) a exploité les données obtenues sur la structure et l'abondance des nitrifiants pour expliquer le plus fort taux de nitrification brute observée sous certains cultivars de riz. Avec la même démarche Mendum et al. (1999) ont montré que l'augmentation de la nitrification brute après apport d'N n'était pas due à une augmentation des effectifs des AOB. Ce résultat leur a permis d'émettre l'hypothèse que cette augmentation de nitrification était due à des changements phénotypiques (augmentation de l'activité spécifique des AOB).

## **8. Conclusion**

L'effet des changements de mode de gestion n'a pas, pour l'instant, été mis au centre des problématiques de l'écologie microbienne et ce, malgré l'importance des perturbations qu'ils provoquent sur les processus biogéochimiques ; encore très peu d'études ont été jusqu'ici conduites sur ce sujet. La composante bactérienne du sol est encore parfois perçue comme une boîte noire à l'origine de divers processus, mais de plus en plus d'études s'attèlent à la caractériser plus finement afin de déterminer comment les modifications des caractéristiques des communautés bactériennes peuvent aider à comprendre et prédire les modifications observées du niveau de réalisation de ces processus. Seule une minorité des études a été réalisée afin de comprendre la cinétique des réponses observées après le changement de mode de gestion et d'évaluer les capacités de résistances des communautés bactériennes. Bien que la réponse des communautés bactériennes puisse être fortement influencée par leur microlocalisation, une seule étude a pris en compte une échelle spatiale plus fine que celle de la couche de sol. La majorité des études a porté sur deux caractéristiques parmi les trois les plus souvent utilisées pour caractériser une communauté





bactérienne (activité, effectif, et structure) et seules quelques unes ont cherché à déterminer un lien entre les changements de structure et les changements d'activité bactérienne.

A partir de cette synthèse, se dessine une certaine dichotomie des problématiques et donc des résultats acquis par les différentes études:

-les études en écologie des écosystèmes ou en sciences du sol ont plutôt cherché à déterminer (i) les effets des changements de gestion sur les différentes caractéristiques des communautés bactériennes et (ii) les interactions entre les communautés bactériennes et les variables environnementales. Majoritairement, c'est la communauté bactérienne totale qui était ciblée et les mesures des activités étaient des activités enzymatiques.

-les études d'écologie microbienne ont, elles, plutôt cherché à déterminer précisément la structure des communautés bactériennes après les changements de gestion et les effets des variables environnementales sur ces structures de communautés. Les communautés bactériennes fonctionnelles ont fait l'objet de plus d'attention mais les mesures d'activité faites dans ces études restaient des mesures d'activités nettes.

Pour résumer, on peut dire que les études d'écologie microbienne ayant analysé les effets des changements de mode de gestion ont axé leur problématique autour de « qui est présent » alors que les études d'écologie des écosystèmes ou de sciences du sol ayant abordé ce sujet ont axé leur problématique autour du fonctionnement des systèmes sol. Apparemment, aucun problème méthodologique n'est à l'origine de cette séparation des approches, et la raison est certainement à rechercher dans les différences d'histoire de ces disciplines et de culture scientifique. Sur les 40 études recensées, seules quelques-unes ont franchi cette barrière « disciplinaire » pour aller vers la compréhension des changements d'activité à travers les changements d'effectif et de structure. Cependant aucune d'entre elles n'a utilisé des mesures de flux élémentaires (ou flux bruts) pour caractériser les niveaux d'activité dans le sol en relation avec le fonctionnement microbien.

Etant donné le fort potentiel du couplage de ces 2 problématiques, nous avons axé les travaux de cette thèse dans cette interdisciplinarité pour une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu dans la réponse des communautés bactériennes du sol après changements de gestion.



## **Chapitre 1- Partie 2**

**Objectifs scientifiques et choix des situations  
agronomiques et des communautés bactériennes**



---

## Premier chapitre - Partie 2 :

### Objectifs scientifiques et choix des situations agronomiques et des communautés bactériennes pour ce travail de thèse

---

#### 1. Les principaux objectifs de la thèse

Les principaux objectifs de ce travail de doctorat ont été de déterminer les réponses de communautés bactériennes du sol soumises à des changements de gestion agricole en essayant de répondre aux questions suivantes :

Q1 : à quelle vitesse les communautés bactériennes du sol répondent-elles après des changements de gestion ?

Q2 : dans quelle mesure les caractéristiques (activité, effectif, structure) des communautés bactériennes du sol dans les agroécosystèmes sont-elles influencées par la gestion passée, la gestion actuelle, ou à la fois la gestion passée et la gestion actuelle ?

Q3 : les réponses des communautés bactériennes après des changements de gestion dépendent-elles de la micro-localisation des bactéries dans le sol ?

Q4 : les réponses observées sont-elles très semblables entre communautés ou peuvent-elles différer fortement notamment entre des communautés bactériennes fonctionnelles dont les caractéristiques taxonomiques et écologiques sont contrastées ?

Q5 : quelles sont les variables clés pilotant la réponse de communautés bactériennes fonctionnelles différant par leurs caractéristiques taxonomiques et écologiques ?

Ces cinq objectifs ont été abordés dans les chapitres 2 à 5 selon la structure suivante :

Dans le **chapitre 2**, j'ai analysé les changements de la structure génétique de la communauté bactérienne du sol, en prenant en compte ou non la microlocalisation de ces bactéries, dans un contexte de changement réciproque de régime de pâturage en prairie, c'est-à-dire application et arrêt du pâturage. Ce chapitre aborde donc les questions Q1, 2 3 & 5, en se focalisant sur la communauté eubactérienne dans des systèmes prairiaux.

Dans le **chapitre 3**, j'ai étudié les changements de l'activité de nitrification du sol suite à des changements de techniques de labour/non labour dans des sols agricoles, et évalué dans quelle mesure ces changements résultent de changements de l'abondance et/ou de la diversité de la



communauté des bactéries nitrifiantes, et sont expliqués par des facteurs environnementaux pouvant a priori piloter les changements de nitrification : disponibilité en azote, humidité du sol, carbone organique. Ce chapitre aborde donc les questions Q1, 2 & 5, en se focalisant sur la communauté bactérienne nitrifiante dans des systèmes de grandes cultures.

Le **chapitre 4** présente les effets de 2 types de changements de gestion (application/arrêt du labour en sol agricole de culture annuelle ; et conversion réciproque prairie/culture) sur la communauté bactérienne dénitrifiante. J'ai analysé et discuté les relations entre changements d'activité dénitrifiante d'une part, et abondance et structure génétique de la communauté dénitrifiante d'autre part. J'ai également évalué et essayé de hiérarchiser le rôle (i) de l'abondance et de la structure de communauté, et (ii) des facteurs environnementaux (humidité, contenu en nitrate du sol, carbone organique du sol), pour expliquer la réponse de l'activité dénitrifiante. Ce chapitre aborde donc les questions Q1, 2 & 5, en se focalisant sur la communauté bactérienne dénitrifiante dans deux systèmes : rotation de grandes cultures, et rotation culture/prairie temporaire.

Le **chapitre 5** présentera pour la situation de prairie/culture annuelle de cette étude, la dynamique des compartiments du carbone et des transformations de l'azote associés à l'activité de la biomasse microbienne hétérotrophe dans le sol sous prairie et sous grande culture, et établira les effets du changement de mode d'occupation au cours d'une cinétique de 24 mois. Ceci permettra de discuter l'importance respective des processus de minéralisation, organisation et nitrification de l'azote dans la dynamique de l'azote minéral du sol, et le rôle du carbone organique dans l'importance de ces processus.

Pour cette thèse, nous avons choisi d'étudier la réponse, face à des changements de mode de gestion fréquents en France, de communautés bactériennes importantes pour le fonctionnement des agro-écosystèmes car impliquées dans le cycle de l'azote.





## **2. Contexte agronomique et choix de situations de changement de mode de gestion pour notre étude**

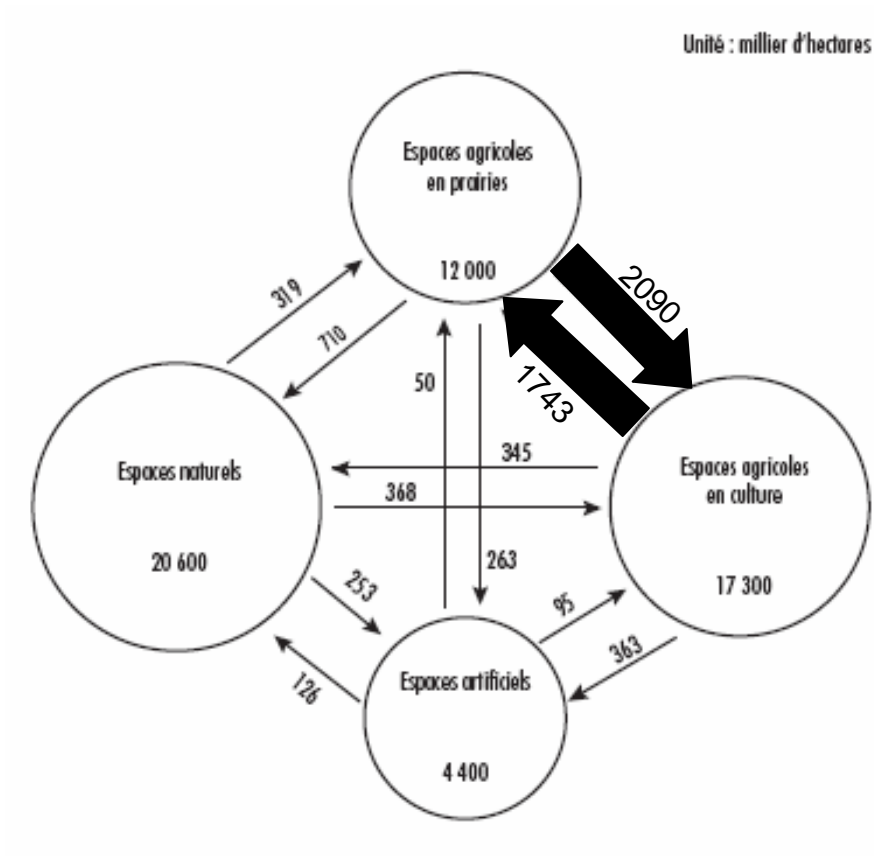
En 2003, le territoire français consacrait 54% de sa superficie totale à l'agriculture et se classait ainsi au huitième rang des 27 pays de l'UE. La Surface Agricole Utile française est notamment composée de 27 % de terres arables et 23 % de prairies (Rabaud, 2005).

Les 3 situations agronomiques mises en place pour nos études ont été des situations de conversion réciproque de modes de gestion, i.e. changement d'un mode gestion ou d'utilisation A vers B et en parallèle, changement d'un mode de gestion ou d'utilisation B vers A. Chaque situation agronomique choisie représentait des scénarios importants dans le paysage agricole français.

### **2.1 Conversion entre modes de gestion intensif et extensif de prairies pâturées**

Sur l'ensemble des prairies françaises, 86 % des parcelles ont été pâturées par des animaux en 1998. Plus précisément, la moitié des prairies permanentes sont exclusivement pâturées, deux prairies temporaires sur trois sont fauchées et pâturées, et les prairies artificielles sont principalement fauchées (Palacio-Rabaud, 2000).

Malgré les nombreuses contraintes environnementales et/ou socio-économiques conduisant les prairies vers l'intensification ou vers la désintensification (notamment avec la mise en place de primes émanant des instances européennes pour le maintien de l'élevage extensif) très peu de données chiffrées sont effectivement disponibles dans la littérature scientifique. En revanche, de nombreuses études ont étudié les effets des changements de mode de pâturage sur les communautés bactériennes du sol. Cependant ces études ont analysé un seul type de changement de mode de gestion : vers l'intensification ou vers l'extensification, mais pas les 2 simultanément. Ces études ont très majoritairement été réalisées avec une ou deux dates de prélèvements de sol intervenant plusieurs années après les changements ce qui ne permet pas la compréhension de la mise en place des effets des changements de pâturage sur les communautés bactériennes. De plus aucune de ces études n'a pris en compte les effets de la microlocalisation bactérienne dans la réponse des communautés à ces changements de pâturage.



Lecture : par exemple, les espaces naturels occupent 20,6 millions d'hectares en 2002. 319 milliers d'hectares d'espaces naturels de 1992 sont devenus des espaces agricoles en prairies en 2002 ; à l'inverse, 710 milliers d'hectares de prairies de 1992 sont devenus des espaces naturels en 2002.

**Figure 18:** Quantification des surfaces en fonction de leur mode de gestion en France, et quantification des surfaces ayant subi différents types de changements de mode de gestion entre 1992 et 2002. Les flèches noires correspondent au type de conversion prairies/culture que nous avons étudiée. D'après Lee and Slak (2007).

## **2.2 Conversion réciproque entre prairie et culture dans le cadre de la réintroduction de prairies temporaires dans les rotations culturales**

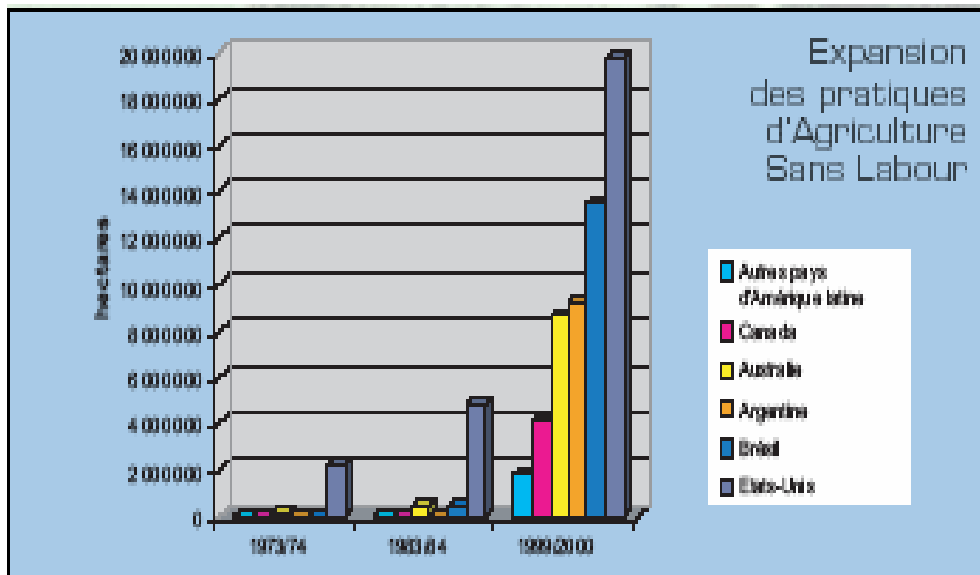
Les paysages agricoles varient beaucoup au cours des années : entre 1992 et 2002, au total, 6.7 millions d'hectares ont changé de destination entre prairies, cultures, espaces naturels, espaces artificiels, soit environ 12 % de la surface de la France (Lee and Slak, 2007).

Plus précisément, pendant ces onze années, les prairies ont officiellement perdu environ 7 % de leur surface. Cependant, ce transfert net de 350 000 hectares de prairie vers les terres arables provient de deux types de changements de gestion (Fig. 18). Le plus important a conduit à la mise en culture de plus de 2 millions d'hectares de prairies. Et le second a conduit à l'implantation de 1.7 million de prairies sur d'anciennes terres arables. Les espaces agricoles se retrouvent donc face à de nombreux remaniements, composés en grande partie par le changement réciproque des prairies en culture (57 % des échanges de mode de gestion/utilisation des terres agricoles) (Agreste-cahiers, 2007; Lee and Slak, 2007).

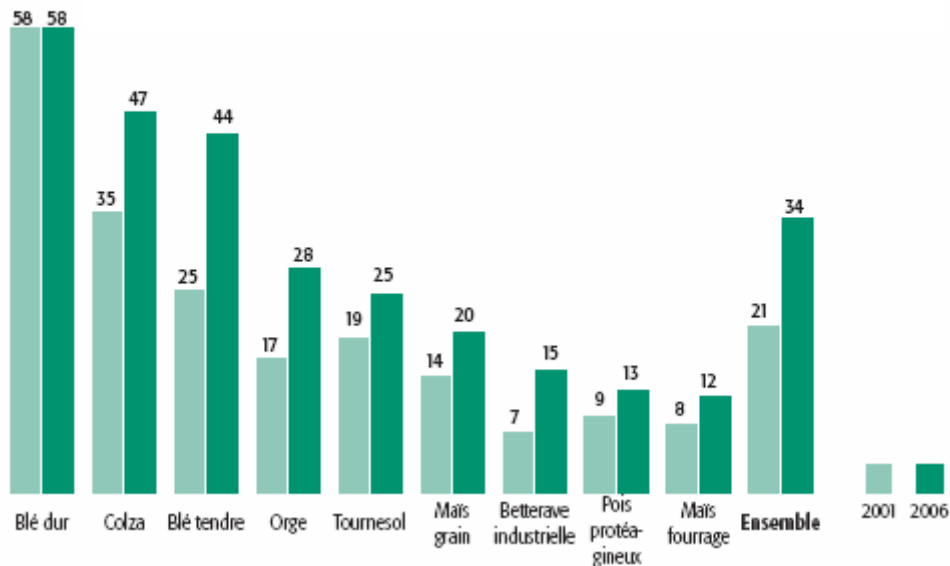
## **2.3 Conversion réciproque entre labour et non labour en situation de grande culture**

Durant la dernière décennie, les techniques de labour ont été mises en cause dans de nombreux problèmes de gestion des agrosystèmes. Elles seraient à l'origine d'une baisse des stocks de carbone organique conduisant à des problèmes de fertilité du sol et d'érosion des terres arables dans certains contextes (Tebrügge and Düring, 1999; Machado and Silva, 2001; Wang et al., 2007). Dans le contexte plus récent du changement global, le stockage de carbone organique dans les sols favorisé par l'abandon du labour est parfois aussi mis en avant comme une réponse au problème de l'effet de serre. La mise en place de techniques de labours réduits, voire de l'arrêt total du labour des terres cultivées, est donc en forte augmentation au niveau mondial (Fig. 19 à partir de FAO, 2008). Par exemple, de 1990 à 2000 aux USA, les surfaces agricoles soumises à ces pratiques de « conservation tillage » (travail superficiel et absence de labour) ont triplé pour atteindre 18% des cultures (USDA, 2001). En France, cette technique est également en augmentation constante : en 2006, un tiers des cultures annuelles ont ainsi été implantées sans retournement préalable du sol contre 21 % 5 ans plus tôt (Chapelle-Barry, 2008 ; Rabaud, 2004) (Fig. 20). Cette tendance est particulièrement prononcée dans les grandes exploitations (>400ha) où 58 % des surfaces ne sont pas labourées.

Cependant, l'arrêt du labour présente également des inconvénients. Les mauvaises herbes germeraient plus facilement du fait de leur non enfouissement en profondeur. Il en ressort une nette augmentation de l'utilisation des herbicides par les agriculteurs utilisant le



**Figure 19:** Expansion des pratiques de culture sans labour au niveau mondial. Source FAO <http://www.fao.org/ag/ca/doc/Y3782f.pdf>



**Figure 20:** Evolution des surfaces de grandes cultures semées sans labour préalable en France entre 2001 et 2006. D'après Chapelle-Bary (2008).

moindre travail du sol (Chapelle-Barry, 2008). De plus, malgré une baisse des émissions de CO<sub>2</sub>, cette technique de non-labour serait à l'origine d'une augmentation des émissions de N<sub>2</sub>O par les sol (gaz à effet de serre 300 fois plus puissant que le CO<sub>2</sub>) (Oorts et al., 2007). Ces inconvénients, surtout ceux liés à la gestion des adventices et à la consommation des pesticides, poussent donc les gestionnaires des agrosystèmes à revenir, au moins ponctuellement, aux techniques de labour conventionnel. Ainsi, même si 34 % des surfaces sont dispensées de labour en 2006, seules 11 % n'ont jamais été retournées depuis 2001 (Chapelle-Barry, 2008).

#### **2.4. Choix des situations et dispositifs agronomiques pour notre étude par rapport à ce contexte agronomique**

Notre choix des différentes situations agronomiques a été dicté par plusieurs critères. Tout d'abord, les changements de gestion que nous avons choisis d'étudier correspondaient tous les trois aux situations fréquemment retrouvées dans le paysage agricole français décrites ci-dessus. Pour les 2 sites en plein champ (conversion labour/non labour et prairie/culture), leur superficie était importante et la gestion culturale et agronomique était bien maîtrisée. Ces conditions nous ont permis de travailler avec de vrais répliqués de terrain (parcelles), en nombre suffisant (4 répliqués pour chaque traitement). Pour le 3<sup>ème</sup> dispositif (mésocosmes de prairie), la gestion (pâturage par des ovins) a été parfaitement maîtrisée car simulée par coupe de la végétation et apport d'urine artificielle de mouton 5 fois par an. Enfin, le mode de gestion devait pouvoir être maîtrisé sur nos sites sur plusieurs années pour que nous puissions conduire notre étude sur une période suffisante en fonction des résultats observés (a priori plusieurs années).

##### *Choix d'un site d'étude dans le contexte des modes de gestion intensif et extensif des prairies semi-naturelles*

Concernant le premier contexte de changement de gestion, notre but a été d'étudier simultanément l'intensification et l'extensification du mode de pâturage, dans des prairies semi-naturelles non fertilisées. Les prairies concernées avaient déjà fait l'objet d'études concernant les effets du pâturage sur des communautés fonctionnelles du cycle de l'azote (Patra et al., 2005; Patra et al., 2006). Le travail présenté ici a donc eu pour but d'apporter des informations quant aux effets des changements de mode de pâturage sur la communauté bactérienne et notamment du rôle que peut avoir la micro-localisation des bactéries pour leur



réponse après changement du régime de pâturage. Afin d'obtenir une meilleure maîtrise des perturbations engendrées par le pâturage, nous avons choisi de conduire notre étude en mésocosmes (monolithes de sol avec la végétation native issus de parcelles de prairies initialement gérées intensivement et extensivement). Dans les mésocosmes, le pâturage était simulé par un apport d'urine synthétique et par la coupe uniforme du couvert végétal pour éviter les problèmes d'hétérogénéité spatiale causée par le pâturage *in situ* (pachts d'urine, pâturage sélectif de certaines espèces végétales, compaction hétérogène du sol due au piétinement des animaux). L'application du pâturage a consisté à simuler une application du pâturage sur les prairies initialement non pâturées. L'arrêt du pâturage a consisté à stopper la gestion par le pâturage sur les prairies initialement pâturées intensivement. Des mésocosmes « contrôles » ont été conservés : (i) maintien d'un pâturage simulé sur les prairies intensives (ii) pas d'apport d'urine et pas de coupe de la végétation sur les prairies non pâturées.

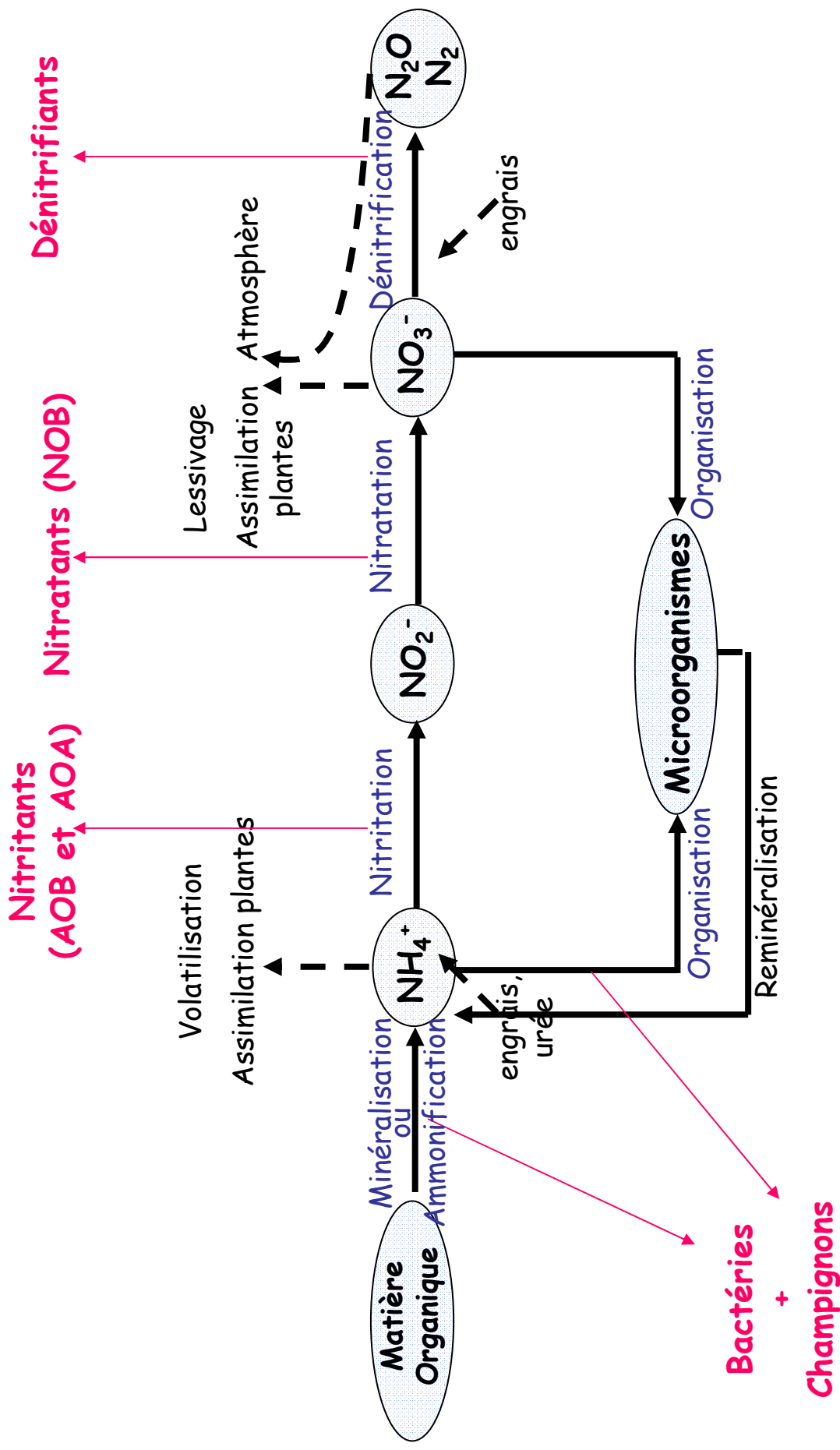
#### *Choix d'un site d'étude dans le contexte de l'alternance cultures annuelles/prairies temporaires*

Pour le 2<sup>ème</sup> contexte de changement de mode de gestion, à savoir la conversion prairie-culture, notre étude a été réalisée sur un site ORE (Observatoire de Recherche en Environnement « Agroécosystèmes, Cycles Biogéochimiques et Biodiversité », site de Lusignan) où est étudié le rôle de l'introduction de prairies temporaires dans des rotations culturales. Ceci nous a permis d'étudier les effets de (i) l'implantation d'une prairie sur des sols initialement cultivés, et (ii) l'implantation d'une culture sur des sols initialement sous prairie. La moitié des sols a conservé sa gestion initiale (sols contrôles « culture » et « prairie »).

#### *Choix d'un site d'étude dans le contexte de l'utilisation de pratiques de labour ou non labour dans des systèmes de cultures annuelles*

Pour le 3<sup>ème</sup> contexte de changement de gestion, notre étude a été faite sur un site de suivi long terme (Site expérimental d'Arvalis-Institut du Végétal à Boigneville). Sur ce site sont appliquées des pratiques culturales identiques du point de vue des rotations de culture, des apports de fertilisants et des traitements phyto-sanitaires, mais en utilisant soit un travail du sol simplifié par utilisation du semis direct (non labour) soit le labour. Un changement des pratiques de labour a été effectué sur la moitié des parcelles (i) en mettant en place le labour sur les cultures initialement non labourées et (ii) en arrêtant le labour sur les cultures





**Figure 21:** Schématisation du cycle de l'azote dans les agroécosystèmes présentant comment les processus que nous avons pris en compte dans cette thèse (en bleu) et les micro-organismes qui réalisent ces processus (en rouge) sont fonctionnellement liés. A noter que d'autres processus (fixation de  $\text{N}_2$ , anamox) a priori peu importants dans écosystèmes que nous avons étudiés, ne sont pas représentés ici.

initialement labourées. La moitié des autres parcelles a été maintenue avec le travail du sol initial pour disposer de contrôles « labourés » et « non labourés ».

Chaque site a été échantillonné cinq fois pendant 1.5 à 3 ans, avec des échantillonnages plus fréquents en début d'expérimentation, pour nous permettre de caractériser la mise en place des réponses des communautés bactériennes du sol et leurs capacités de résistance après les changements de mode de gestion.

Nous avons choisi de travailler dans plusieurs contextes de changements de gestion plutôt que d'appuyer toutes nos recherches dans un seul contexte pour plusieurs raisons. Tout d'abord, nous souhaitons dégager des tendances aussi générales que possible sur la réponse des communautés bactériennes du sol aux changements de gestion, notamment en terme de temps de réponse (Q1) ou d'importance relative du mode de gestion passée et du nouveau mode de gestion (Q2). Il nous fallait donc éviter de donner ici une réponse qui soit spécifique d'un site.

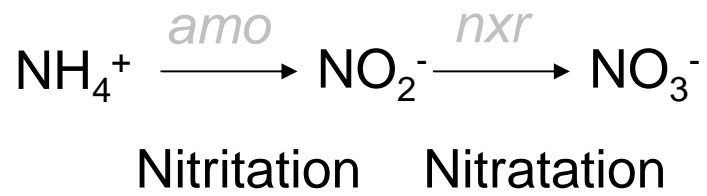
### **3. Le cycle de l'azote et les communautés fonctionnelles bactériennes impliquées dans ce cycle : choix des communautés étudiées pour notre étude**

#### **3.1. Rappels sur le cycle de l'azote dans les sols**

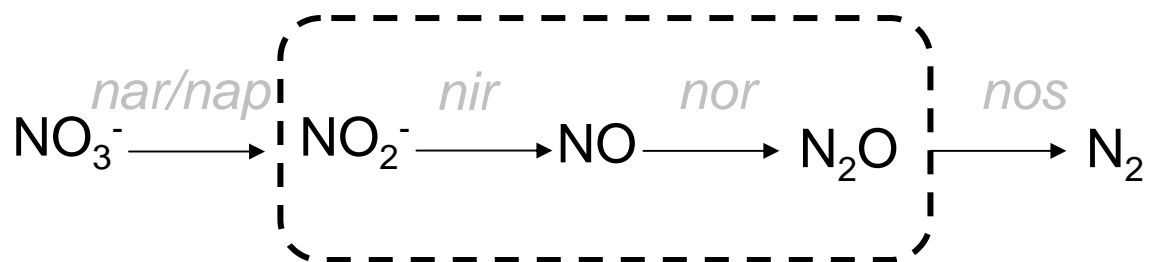
Le cycle de l'azote est un cycle biogéochimique majeur ayant d'importantes répercussions dans de très nombreux systèmes biologiques (marin, lacustre, terrestre, atmosphérique, traitement des eaux usées...). Il s'agit d'un cycle relativement complexe, impliquant des formes chimiques de l'azote sous forme gazeuse, dissoute, particulaire, organique ou minérale et à divers états d'oxydation. Dans les agrosystèmes, la connaissance des caractéristiques de ce cycle est particulièrement importante du fait de ses implications dans la fertilité des sols mais également dans les phénomènes de pollution et de dépollution (Fig. 21). La plupart des étapes de réduction et oxydation de l'azote sont réalisées par des bactéries, des archéobactéries, et des champignons. Dans les paragraphes suivants, nous développerons plus particulièrement 3 des étapes de ce cycle réalisées par les microorganismes : la minéralisation de l'azote organique, la nitrification et la dénitrification.

**L'ammonification (ou minéralisation)** est une oxydation de l'azote organique (protéines, acides aminés) des matières organiques « mortes » qui est réalisée par de très nombreux microorganismes hétérotrophes. Ceux-ci récupèrent de l'énergie des réactions

A



B



**Figure 22:** Etapes impliquées dans les processus de nitrification (A) et de dénitrification (B)

En pointillés : étapes qui seraient réalisées par la majorité des dénitrifiants.  
En gris, gènes clés impliqués dans chaque étape.

d'oxydation, dont un produit final est l'ammonium. Cette étape clé est donc fortement liée au cycle du carbone. L'ammonium peut également provenir de la **fixation de l'azote atmosphérique** par les organismes diazotrophes, bactéries et archéobactéries, possédant une enzyme spécifique, la nitrogénase (Newton, 2007). L'ammonium produit par ces processus de minéralisation de l'azote et de fixation de N<sub>2</sub> pourra avoir plusieurs « destins » : (i) soit être pris en charge par des processus biologiques : être assimilé par les plantes, par les microorganismes (organisation de l'azote), ou être nitrifié, (ii) soit être pris en charge par des processus physico-chimiques: être volatilisé sous forme ammoniac, être fixé sur les argiles.

**La nitrification** correspond à l'oxydation de l'ammonium en nitrite puis en nitrate (Prosser, 1989). L'ammonium est produit naturellement par les processus cités plus haut mais il peut également provenir, dans les agrosystèmes, de l'urée des animaux ou de fertilisants. Le nitrate produit pourra (i) être absorbé, réduit puis assimilé (organisé) par les microorganismes, (ii) être absorbé puis réduit par les plantes pour satisfaire leurs besoins en azote, être le substrat pour les dénitrifiants.

La nitrification autotrophe est réalisée en 2 étapes par 2 groupes bactériens : les **nitritants** (ou Ammonia-Oxidizing Bacteria AOB) et les **nitratants** (ou Nitrite-Oxidizing Bacteria NOB qui oxydent le nitrite en nitrate Figure 22A). Récemment, Leininger et al., (2006) ont mis en évidence des archéobactéries pouvant également réaliser la 1<sup>ère</sup> étape, avec des abondances pouvant être plus importantes que celles des AOB. Malgré leur rôle crucial dans les écosystèmes, les bactéries nitrifiantes ne représentent qu'une infime part de la communauté bactérienne totale (moins de 1%) (voir caractéristiques dans le Tableau 1). Leur croissance est très lente, avec des temps de génération au laboratoire allant de 8h pour *Nitrosomonas* jusqu'à 60h pour *Nitrospira* (Bock et al., 1986).

Les AOB sont des bactéries autotrophes aérobies qui tirent leur énergie de l'oxydation de l'ammonium en nitrite. Dans le sol, les AOB constituent un groupe monophyllétique représenté par les genres *Nitrosomonas* et *Nitrospira* ( $\beta$ -proteobacteries) (Fig. 23). En milieu aquatique, le genre *Nitrosococcus* ( $\gamma$ -proteobacteries) peut également être trouvé. La réaction d'oxydation du NH<sub>4</sub><sup>+</sup> est catalysée par l'ammonium monooxygénase dont le gène *AmoA* code la sous-unité catalytique et peut servir à leur détection (le 16S peut également être employé, du fait de leur origine monophyllétique dans les sols).

Parmi les 4 genres de NOB décrits, 2 sont caractérisés dans les sols : *Nitrobacter* ( $\alpha$ -proteobacteria) et *Nitrospira* (phylum Nitrospirae) (Fig. 23). Très récemment un nouveau

Diversité taxonomique	Processus et Diversité des réactions enzymatiques	Caractère obligatoirement de l'activité	Temps de génération	Effectifs
Hétérotrophes	Dégradation de la matière organique dont minéralisation de l'N	variable	++++ ex: 20 min <i>E.coli</i>	≈95% des bactéries totales
Dénitrifiants	Dénitrification: 4 étapes <sup>5</sup>	-, i.e facultatif	+++ ex: <i>2H P. aeruginosa</i> <sup>2</sup> .	$10^7 \text{ g}^{-1} \text{ sol sec}$ (A, B)
Nitrifiants				
AOB	Nitrification: 1 étape <sup>6,7</sup>	+++	+ ex: <i>Nitrosomonas</i> <sup>4</sup>	$10^6 \text{ g}^{-1} \text{ sol sec}$ pour chaque groupe (C)
NOB	Nitrification: 1 étape <sup>6</sup>	+++	+ ex: 10h <i>Nitrobacter</i> 60h <i>Nitrospira</i> <sup>4</sup>	$10^4 \text{ g}^{-1} \text{ sol sec}$ (A)

**Tableau 1:** Caractéristiques des communautés bactériennes hétérotrophes, dénitrifiantes et nitrifiantes du sol

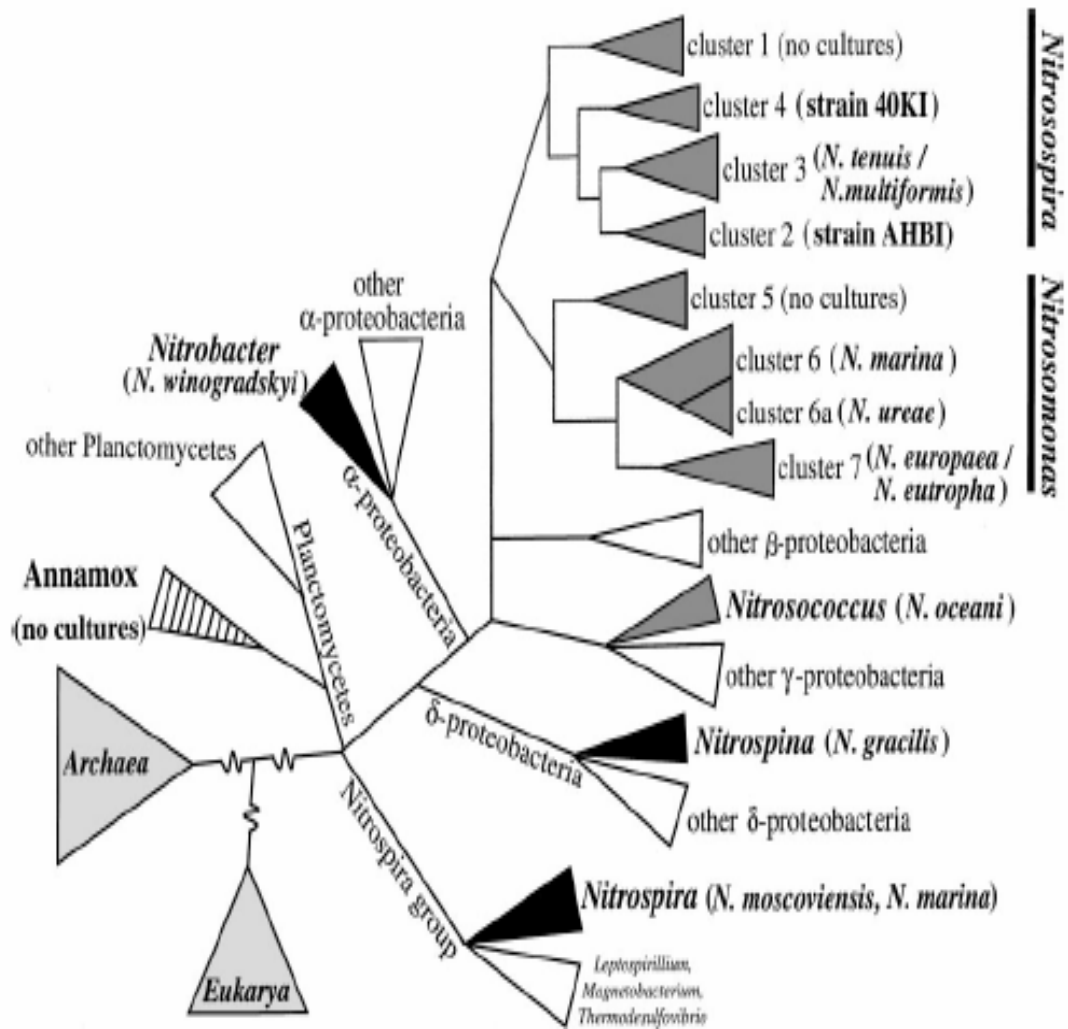
1: Zumft (1997) ; 2: Kowalchuk and Stephen (2001) ; 3: Sharma et al. (2006), 4: Bock et al. (1986); 5: Tiedje (1983); 6: Prosser (1989) ; 7: Leininger et al (2006) ; 8: Alawi et al (2007);

A: Lusignan ; B : Boigneville ; C: Clermont

genre a été décrit par Alawi et al. (2007) dans des sols de permafrost. En milieu aquatique, *Nitrospina* ( $\delta$ -proteobacteria) et *Nitrococcus* ( $\gamma$ -proteobacteria) sont également présents. Les NOB sont des bactéries classées comme autotrophes aérobies qui tirent leur énergie de l'oxydation du nitrite en nitrate bien que des bactéries du genre *Nitrobacter* soient capables de croître en hétérotrophie et en mixotrophie (utilisation du carbone organique). Contrairement aux AOB du sol, les NOB constituent un groupe polyphyllétique. Leur étude a donc été rendue possible grâce à l'utilisation de nouveaux outils moléculaires ciblant le gène fonctionnel *nxrA* qui code la sous-unité catalytique de la nitrite-oxido réductase (Poly et al., 2008; Wertz et al., 2008)

Enfin, certains hétérotrophes, bactéries ou champignons, peuvent oxyder l'azote organique pour produire des nitrates (par ex *Paracoccus denitrificans*). Cette nitrification hétérotrophe ne permet pas la croissance des organismes mais, vu la grande diversité physiologique de ces organismes, elle permettrait d'observer une formation de nitrate quantitativement importante dans certains environnements.

**La dénitrification** est réalisée en 4 étapes conduisant à la transformation du  $\text{NO}_3^-$  en composés azotés gazeux, notamment  $\text{N}_2\text{O}$  ou  $\text{N}_2$  (Fig. 22B). La réduction du  $\text{NO}_3^-$  en  $\text{NO}_2^-$  est catalysée par des nitrates réductases *narG* et-ou *napA* pouvant être présentes dans la même bactérie. Strictement, cette étape est une respiration du nitrate pouvant être considérée comme ne faisant pas partie de la dénitrification. La réduction du  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{NO}$  serait quant à elle une étape commune à tous les dénitrifiants. Elle est catalysée par 2 types de nitrite réductases, NIR à cadmium (NIRS) ou à cuivre (NIRK) qui ne se retrouvent pas toutes les 2 dans la même bactérie. Ensuite, le  $\text{NO}$  est réduit en  $\text{N}_2\text{O}$  par l'oxyde nitrique réductase (NOR). La dernière étape correspond à la réduction du  $\text{N}_2\text{O}$  en  $\text{N}_2$  grâce à l'oxyde nitreux réductase (NOS). La dénitrification est un processus d'une importance majeure pour les écosystèmes pour plusieurs raisons. Elle joue un rôle majeur via la production de  $\text{N}_2\text{O}$ , un gaz à effet de serre 300 fois plus puissant que le  $\text{CO}_2$ . Par ailleurs, la réduction du  $\text{NO}_3^-$  peut entraîner des pertes d'azote pouvant être préjudiciables. Certaines études ont montré que plusieurs centaines de kg d'azote pouvaient ainsi être perdues annuellement par un écosystème (Hofstra and Bouwman, 2005). Les conditions nécessaires à l'activité de dénitrification sont l'anaérobiose, la présence de  $\text{NO}_3^-$  et de carbone organique. A l'inverse de la nitrification, la dénitrification est réalisée par des populations très diverses sur le plan taxonomique, incluant par exemple des bactéries gram positif et gram négatif (Tab. 2). La dénitrification est réalisée par au moins 50 genres bactériens connus différents contre seulement 4 pour la nitrification et 4



**Figure 23:** Phylogénie des bactéries nitrifiantes sur la base de leurs séquences d'ANDr16S. Les groupes de bactéries nitrifiantes sont représentés en gris. Les groupes de bactéries nitrifiantes sont représentés en noir. Des espèces références cultivées sont indiquées pour chaque groupe. D'après Kowalchuk & Stephen (2001).

pour la nitratisation. La dénitrification est une activité facultative anaérobie : les bactéries dénitrifiantes peuvent ainsi fonctionner comme d'autres hétérotrophes en conditions d'anaérobiose, et utiliser la dénitrification lorsque des conditions d'anaérobiose surviennent.

La production de  $N_2$  peut également être la conséquence de l'activité des anammox (planctomycètes) qui pour cela, utilisent l'ammonium et le nitrite en conditions anaérobies (Op den Camp et al., 2007). Certains champignons peuvent également réduire le nitrate, en présence d' $O_2$ . Ils peuvent également produire du  $N_2O$  et du  $N_2$  à partir de nitrite et de composés azotés (co-dénitrification). Enfin, le nitrate peut également subir une autre voie de « dénitrification » via la réduction dissimilative vers l'ammonium (DNRA) qui transforme le nitrate en via le  $NO_2^-$  en  $NH_4^+$  par certaines bactéries.

### **3.2. Choix des communautés bactériennes étudiées pour notre étude**

Dans ce travail de thèse, nous avons choisi d'étudier plusieurs communautés bactériennes : **la communauté bactérienne hétérotrophe, la communauté bactérienne nitratante et la communauté bactérienne dénitrifiante du sol**. Toutes jouent un rôle essentiel au sein des agrosystèmes et représentent une large gamme de caractéristiques et d'exigences écologiques (Tab. 1). Ces communautés réalisent des fonctions plus ou moins spécialisées (dans l'ordre croissant : nitrification>dénitrification>minéralisation de l'azote), et présentent des niveaux diversité taxonomique et des effectifs contrastés (dans l'ordre croissant de diversité et d'abondance : communauté bactérienne nitrifiante > communauté bactérienne dénitrifiante> communauté bactérienne totale). Pour chacune de ces communautés, nous avons choisi de déterminer les fonctions réalisées via la mesure de leurs activités enzymatiques. Cette approche permet d'estimer le pool des enzymes fonctionnelles présentes au moment du prélèvement. Contrairement aux mesures d'activités nettes, cette mesure se rapporte donc à une seule et unique fonction. En parallèle nous avons choisi de mesurer les effectifs et les structures génétiques des communautés fonctionnelles dans le but d'expliquer les changements observés d'activités enzymatiques.

Selon les situations de changement de gestion, nous avons choisi d'étudier certaines communautés bactériennes. Dans le contexte des changements de mode de pâturage, nous avons notamment travaillé sur l'impact de la microlocalisation des bactéries pour leur réponse aux perturbations (l'impact du changement de mode de gestion pouvant être plus fort sur les bactéries non protégées par rapport à celles localisées dans les agrégats stables de sol). Pour



Genres	Caractéristiques métaboliques et écologiques
	<b>Organotrophes:</b>
<i>Alcaligenes</i>	Bactéries communes des sols
<i>Agrobacterium</i>	Certaines espèces sont pathogènes des plantes
<i>Aquaspirillum</i>	Certaines espèces sont oligotrophes
<i>Azospirillum</i>	Fixation d'azote (N <sub>2</sub> ), fermentation
<i>Bacillus</i>	Bactéries formant des spores, fermentation, certaines espèces sont thermophiles
<i>Blastobacter</i>	Liée phylogénétiquement à <i>Rhizobium</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	Fixation d'azote (N <sub>2</sub> ) en symbiose avec les légumineuses
<i>Branhamella</i>	Pathogènes des animaux
<i>Chromobacterium</i>	Pigmentation pourpre
<i>Cytophaga</i>	Bactérie gliding, dégradation de la cellulose
<i>Flavobacterium</i>	Bactéries communes des sols
<i>Flexibacter</i>	Bactéries gliding
<i>Halobacterium</i>	Halophiles
<i>Hyphomicrobium</i>	Croissance en présence de substrats carbonés à 1 C, oligotrophes
<i>Kingella</i>	Pathogènes des animaux
<i>Neisseria</i>	Pathogènes des animaux
<i>Parococcus</i>	Halophiles et lithotrophes
<i>Propionibacterium</i>	Fermentation
<i>Pseudomonas</i>	Fréquemment isolés des sols, genre très divers
<i>Rhizobium</i>	Fixation d'azote (N <sub>2</sub> ) en symbiose avec les légumineuses
<i>Wolinella</i>	Pathogènes des animaux
	<b>Phototrophes:</b>
<i>Rhodospseudomonas</i>	Anaérobies, réduction du sulfate
	<b>Lithotrophes:</b>
<i>Alcaligenes</i>	Utilisation du H <sub>2</sub> et hétérotrophes, fréquemment isolés des sols
<i>Bradyrhizobium</i>	Utilisation du H <sub>2</sub> et hétérotrophes, fixation d'azote (N <sub>2</sub> ) en symbiose avec les légumineuses
<i>Nitrosomonas</i>	Oxydation du NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
<i>Parococcus</i>	Utilisation du H <sub>2</sub> et hétérotrophes, halophiles
<i>Pseudomonas</i>	Utilisation du H <sub>2</sub> et hétérotrophes, fréquemment isolés des sols
<i>Thiobacillus</i>	Oxydation du soufre
<i>Thiomicrospira</i>	Oxydation du soufre
<i>Thiosphaera</i>	Oxydation du soufre, nitrification hétérotrophe, dénitrification aérobie

**Tableau 2 :** Principaux genres dénitrifiants actuellement caractérisés. D'après Myrold (1998).

cette étude, nous avons choisi de travailler sur la communauté bactérienne totale limitant par exemple certaines difficultés techniques que nous aurions eu en ciblant les nitrifiants du fait de leur plus faible effectif.

Dans les 2 situations où intervenaient des changements de labour, nous avons choisi de travailler sur la communauté dénitrifiante, du fait de son importance dans les émissions de  $N_2O$  (fort gaz à effet de serre).

Enfin nous souhaitons étudier une communauté peu représentée et aux exigences écologiques fortes (par comparaison avec la communauté dénitrifiante, notamment vis-à-vis de notre objectif Q4). Notre choix s'est porté sur une communauté actuellement très méconnue en raison d'absence d'outils pour l'étudier et de la sous-estimation de son importance dans le système sol : la communauté nitratante.



## **Chapitre 1- Partie 3**

### **Variables mesurées et méthodes utilisées**



---

## Premier chapitre - Partie 3 :

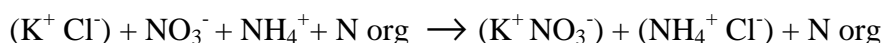
### Variables mesurées et méthodes utilisées

---

Pour mener à bien notre étude, nous avons mesuré des variables telles que des concentrations en azote et carbone du sol, des activités potentielles microbiennes, des flux bruts d'azote, des effectifs et structure génétique de communautés bactériennes, et avons analysé les données obtenues parfois avec des outils statistiques assez performants. Cette partie a pour but de décrire de façon succincte les principales méthodes que nous avons utilisées dans cette thèse.

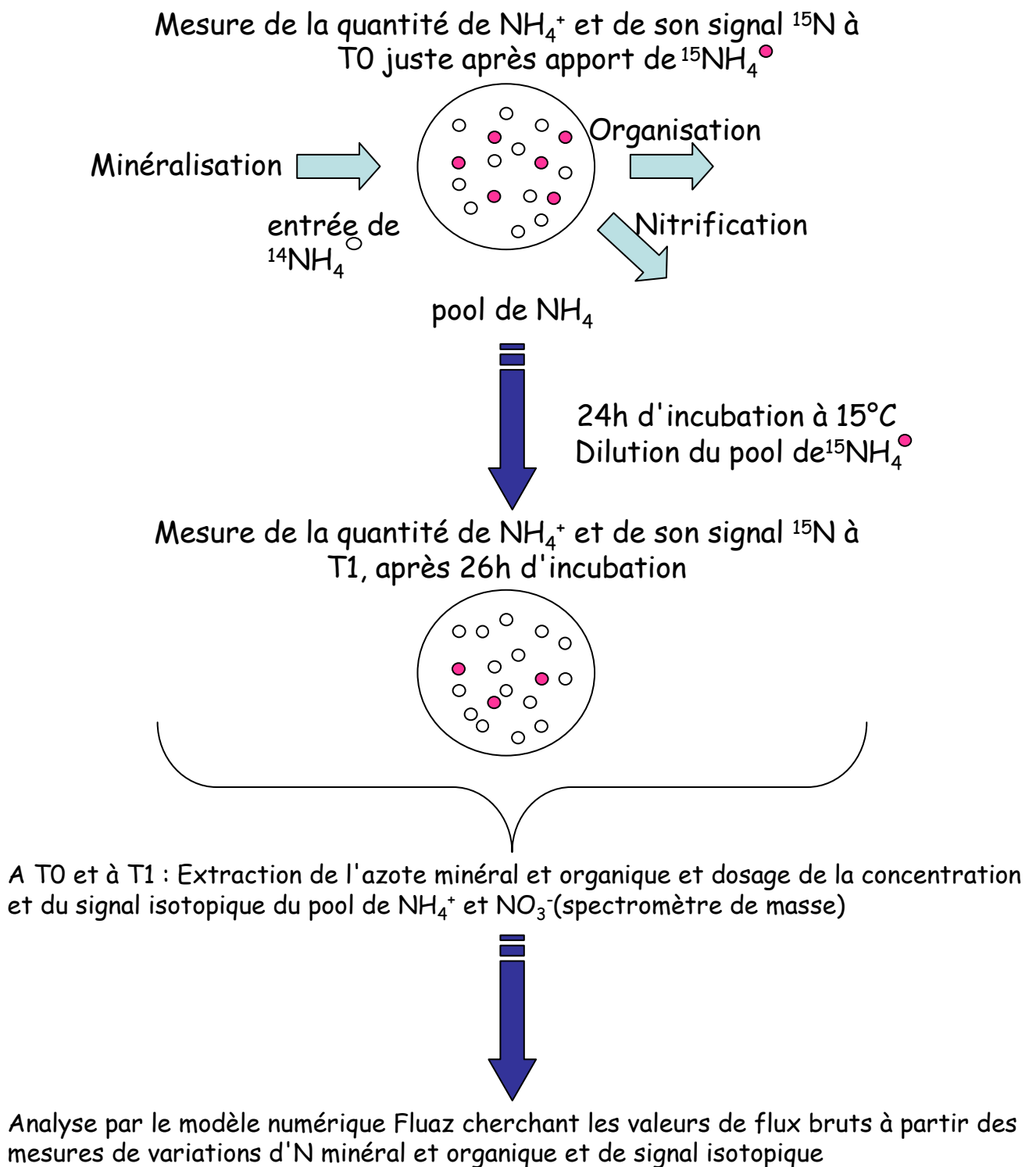
#### **1 Dosage des concentrations en azote minéral, azote organique et carbone organique**

Pour extraire le nitrate et l'ammonium, le sol a été mélangé avec 100mL de KCl 1M selon la réaction suivante :



Après centrifugation, les surnageants ont été filtrés pour obtenir la solution sur laquelle a été dosé l'azote minéral. Le culot, contenant le carbone et l'azote organique, a subi 2 nouvelles étapes de lavages au KCl (pour bien éliminer les traces d'azote minéral). A l'issue de ces étapes, (i) les filtrats contenant l'azote minéral ont été analysés par colorimétrie en flux continu (TRAACS 2000) comme décrit par Kamphake et al. (1967) pour le  $NO_3^-$  et par Krom (1980) pour le  $NH_4^+$  et (ii) le culot final contenant le carbone et l'azote organiques a été séché, broyé et analysé par spectrométrie de masse.

Le carbone de la biomasse microbienne (BMC) a été déterminé par la méthode de fumigation extraction proposée par Vance et al. (1987), modifiée par Chaussod et al. (1988). L'extraction du carbone soluble des échantillons de sol, fumigés et non fumigés avec le chloroforme, a été réalisée avec du  $K_2SO_4$  (0.03M). La concentration en carbone soluble des extraits a été mesurée par un auto-analyseur basé sur l'oxydation à 100°C au persulfate, le  $CO_2$  produit étant mesuré par spectrométrie infrarouge. Le carbone de la biomasse microbienne a été calculé par différence entre les teneurs en carbone soluble des sous échantillons fumigés et non fumigés de chaque échantillon de sol, en utilisant le facteur de correction  $K_{EC}=0.38$  (Vance et al., 1987). Par convention dans ce travail, le carbone organique dissous (COD) des sols présenté, est celui mesuré dans les sous échantillons non fumigés.



**Figure 24:** Principe de la méthode d'enrichissement-dilution  $^{15}\text{N}$  pour mesurer les flux bruts d'azote dans un échantillon de sol

## **2 Mesure des activités potentielles des communautés bactériennes hétérotrophes nitratante et dénitrifiante**

Afin d'évaluer les activités des bactéries hétérotrophes, nitratantes et dénitrifiantes, nous avons choisi de mesurer les activités potentielles de respiration, nitratisation et de dénitrification : ces mesures sont souvent appelées Substrate Induced Respiration (SIR) (Anderson and Domsch, 1978), Nitrifying Oxidizing Enzyme Activity (NOEA) (Smorzewski and Schmidt, 1991) et Denitrifying Enzyme Activity (DEA) (Smith and Tiedje, 1979; Tiedje et al., 1989) dans la littérature. Ce type de mesure se réalise par incubation d'échantillons de sols frais au laboratoire dans des conditions optimales pour la réalisation de ces activités bactériennes en terme de température, oxygénation, et disponibilité en substrats.

Pour la SIR et la NOEA, les sols sont incubés à 28°C, sous agitation pour une bonne oxygénation et avec respectivement un apport de glucose ou de  $\text{NO}_2^-$ . Pour la DEA, les sols sont incubés à 28°C après avoir remplacé l'air ambiant par de l'hélium afin d'obtenir les conditions d'anaérobiose nécessaires à la réalisation de cette activité. Le sol est dans ce dernier cas supplémenté en carbone organique et en nitrate. De l'acétylène est ajouté dans le but de bloquer la réduction du  $\text{N}_2\text{O}$  en  $\text{N}_2$ , pour permettre la mesure de l'accumulation du  $\text{N}_2\text{O}$  sans que celui-ci soit converti en  $\text{N}_2$  (les variations de concentration en  $\text{N}_2$  sont difficilement mesurables du fait de sa forte concentration dans l'atmosphère).

La mesure de l'activité potentielle consiste alors à observer (i) la cinétique d'apparition du  $\text{CO}_2$  et du  $\text{N}_2\text{O}$  par chromatographie en phase gazeuse pour quantifier respectivement la SIR et la DEA, et (ii) la cinétique de disparition du  $\text{NO}_2^-$  par colorimétrie pour la NOEA.

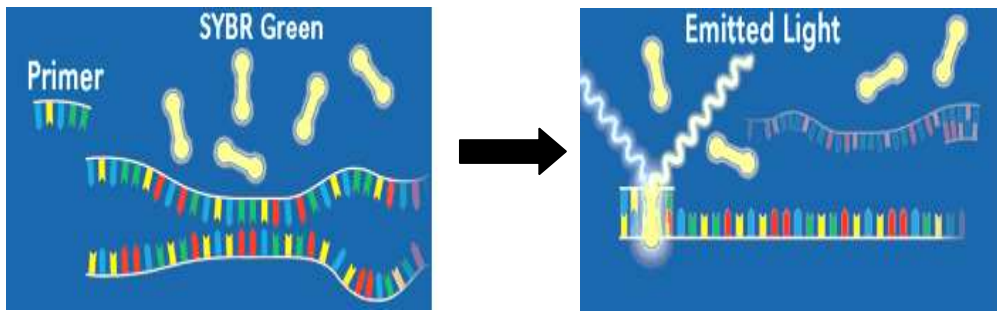
D'un point de vue biologique, une mesure d'activité potentielle revient à une mesure du pool d'enzymes fonctionnellement actives réalisant une fonction donnée.

## **3 Mesure des flux bruts d'azote (minéralisation, organisation, nitrification)**

Comme évoqué dans le chapitre 2, la mesure des flux bruts permet de caractériser les processus élémentaires du cycle interne de l'azote dans le sol (Fig. 24). Cette technique repose sur la méthode d'enrichissement-dilution isotopique  $^{15}\text{N}$ . La minéralisation brute est mesurée en enrichissant le pool de  $\text{NH}_4^+$  avec du  $^{15}\text{NH}_4^+$  (Fig. 24). Après incubation des échantillons, le pool  $^{15}\text{N-NH}_4$  du sol va être dilué par l'apport de  $\text{NH}_4$  non marqué par minéralisation de l'azote. Les variations d'abondance isotopique et les quantités



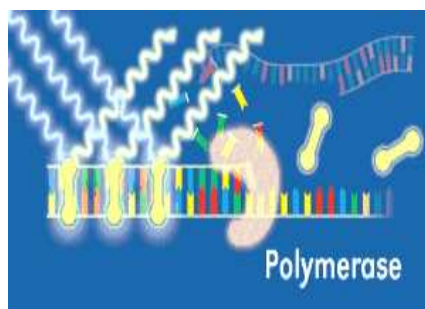
A) Principe du suivi de l'amplification d'une séquence cible lors d'une mesure par PCR quantitative



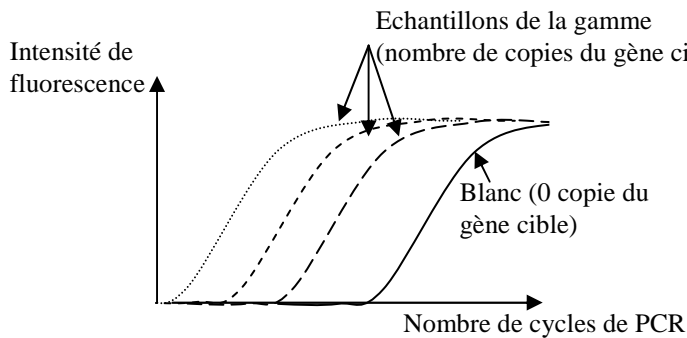
Quand l'ADN est dénaturé (simple brin) le Sybr Green est libre. Il n'y a pas d'émission de fluorescence

Lors de la polymérisation, le Sybr Green se lie à l'ADN double brin en émettant de la fluorescence.

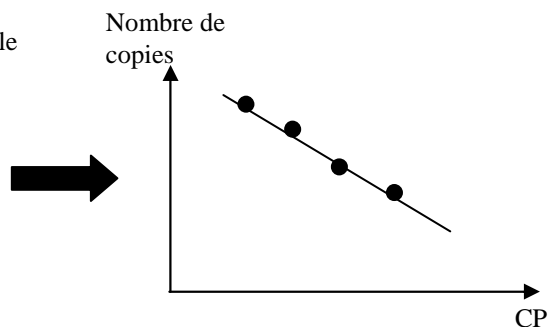
Plus la quantité d'ADN cible polymérisé est grande, plus la fluorescence est intense



B) Principe de la quantification du nombre de séquences cible dans un échantillon grâce au suivi de la quantité d'ADN amplifiée au cours des cycles de qPCR



Détermination du Crossing Point dans la phase exponentielle à l'intersection de la ligne de bruit de fond à la courbe de fluorescence



Etablissement d'une relation entre le nombre de copies et le Crossing Point

A partir des CP des échantillons d'ADN de sol et de la relation précédente, détermination du nombre de copies du gène cible dans les échantillons

**Figure 25:** principe de la PCR quantitative (PCRq) utilisée pour quantifier le nombre de copies des communautés nitrifiante et dénitrifiante.

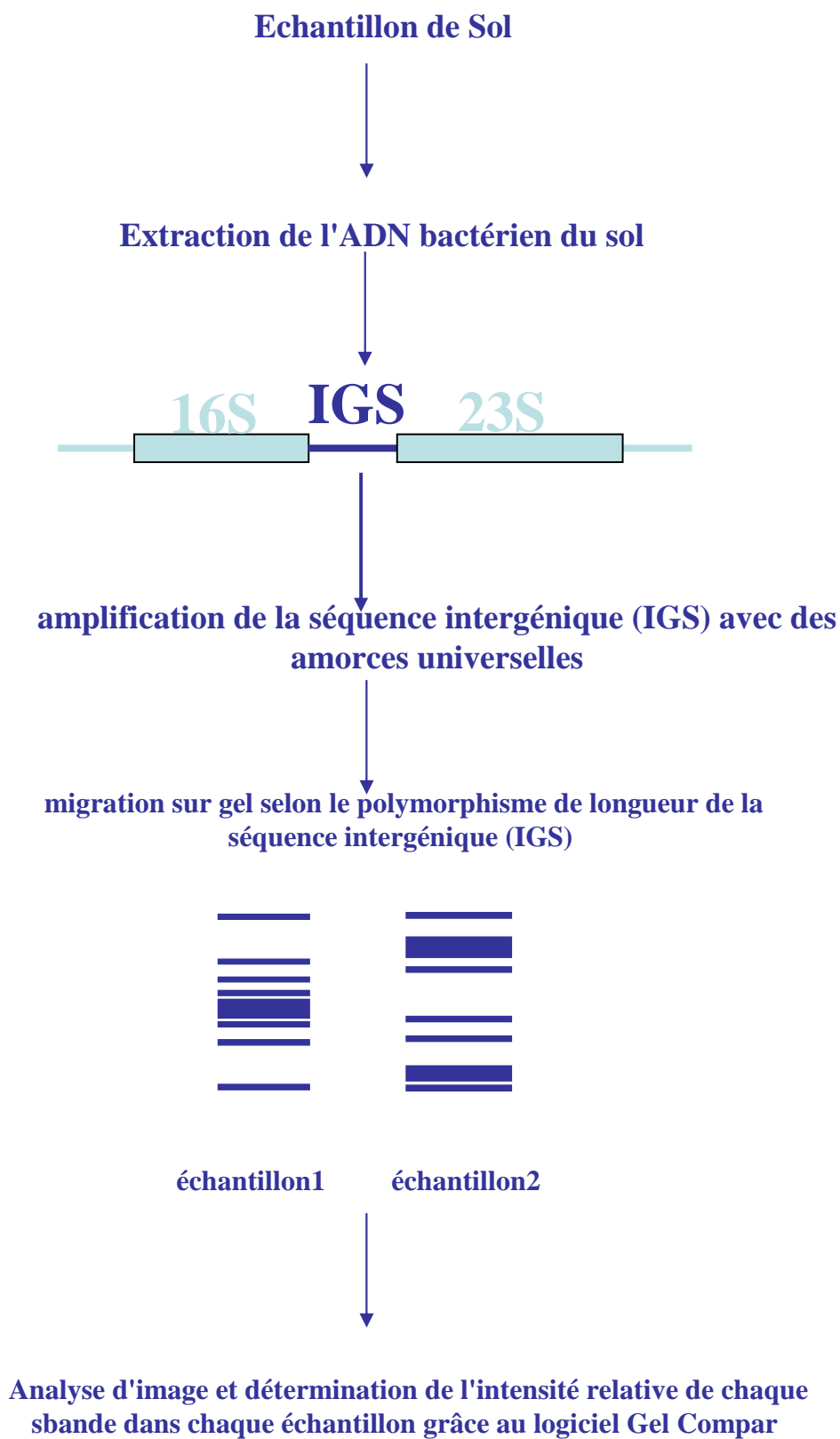
d'ammonium, de nitrate et d'azote organique sont mesurées en début et en fin d'incubation. Pour mesurer la nitrification brute, l'apport de  $^{15}\text{N}$  se ferait sous forme de nitrate. Le calcul des flux se fait classiquement grâce aux équations de dilution/enrichissement isotopique (e.g. Barraclough, 1991) mais il est également possible d'utiliser un modèle numérique pour améliorer l'estimation des flux. Nous avons choisi d'utiliser le modèle Fluaz (Mary et al., 1998) qui permet d'ajuster et de calculer simultanément plusieurs flux (minéralisation, organisation de l'azote, nitrification).

Pour une mesure correcte de ces flux, le marquage du pool de  $\text{NH}_4^+$  doit être le plus uniforme possible (pour une revue, voir Murphy et al. 2003). Principalement, deux techniques d'application du  $^{15}\text{N}$  sont disponibles : la vaporisation d'une solution de  $^{15}\text{NH}_4^+$  suivie par une homogénéisation du sol, et des injections à l'aide d'une seringue de  $^{15}\text{NH}_3$  gazeux dans le sol. La vaporisation engendre une perturbation du sol plus forte mais permettrait d'avoir un apport plus uniforme que l'injection de gaz. De plus, Luxhoi et al. (2005) ont montré que le flux brut de minéralisation n'était pas différent selon les 2 méthodes. Par ailleurs, on peut supposer que si une modification est générée, elle sera similaire pour tous nos échantillons. Notre but étant de comparer les flux entre différents modes de gestion des terres, nous avons donc choisi la méthode de vaporisation de  $^{15}\text{N}$ .

#### **4 Estimation des effectifs bactériens**

Classiquement, les effectifs des bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes dans le sol ont longtemps été estimés par MPN (Most probable number) en mesurant leur croissance dans un milieu de culture et avec un bon niveau d'oxygénation choisi pour chaque communauté (Alexander, 1982). Cependant cette technique est coûteuse en temps et surtout, ne permet de quantifier que les effectifs des bactéries cultivables (estimées à 1% des bactéries totales du sol).

Nous nous sommes donc tournés vers une technique de biologie moléculaire réalisée à partir de l'extraction de l'ADN bactérien du sol : la PCR quantitative (qPCR ; PCR = polymerase chain reaction). Cette technique permet de mesurer la quantité de séquences cibles d'ADN par le suivi de l'amplification de ces séquences grâce à une molécule fluorescente (Sybr Green) (Fig. 25). La qPCR permet de quantifier très précisément la quantité d'ADN cible et donc d'estimer les abondances d'organismes cibles sans biais de cultivabilité. Néanmoins, la qPCR conserve certains biais inhérents à la méthode PCR. Tout d'abord, les biais peuvent provenir de l'étape d'extraction de l'ADN du sol. En effet, il est difficile



**Figure 26:** principe de la méthode RISA (Ribosomal Intergenic Sequence Analysis) utilisée pour estimer la structure génétique de la communauté bactérienne totale

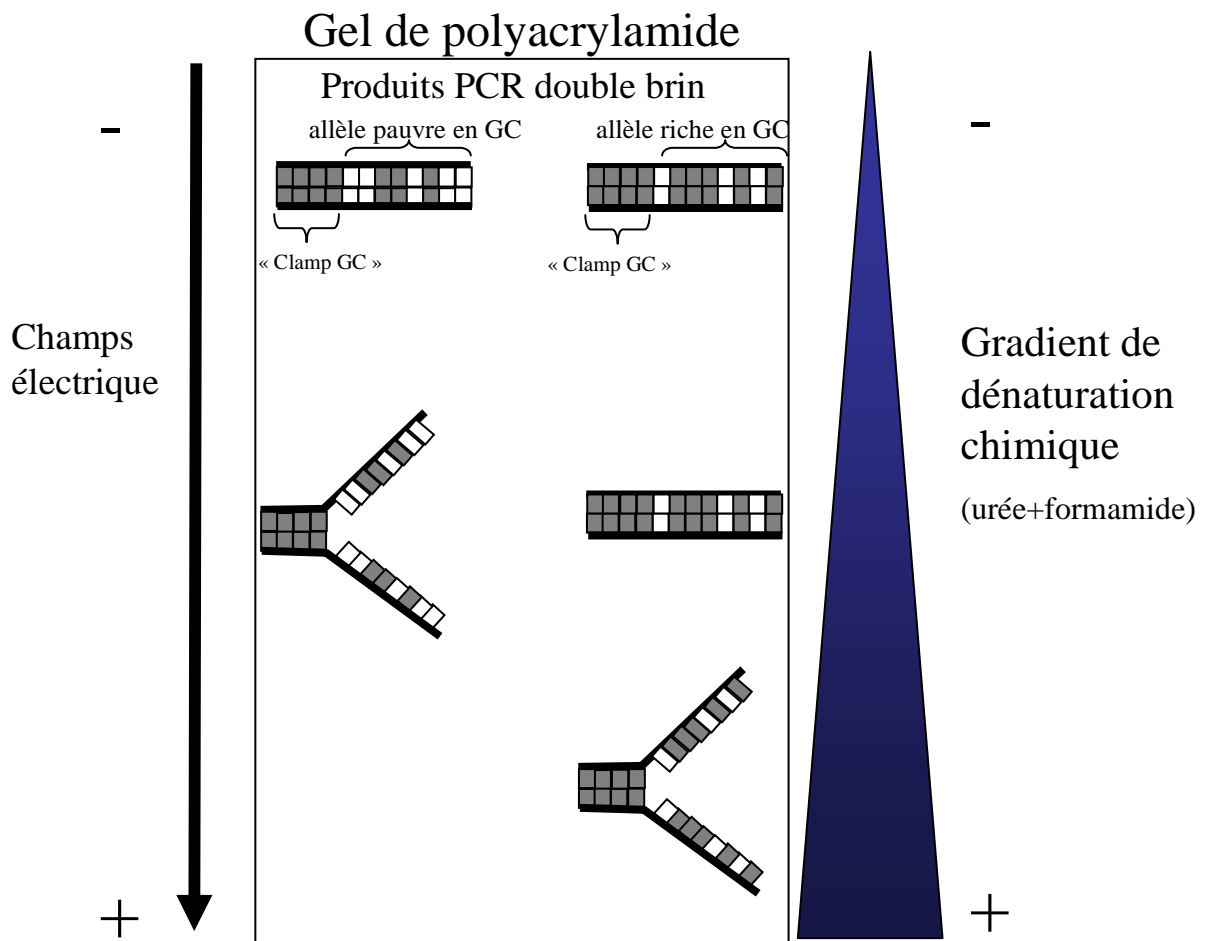
d'extraire l'intégralité de l'ADN bactérien du sol, notamment celui des bactéries protégées dans des agrégats de sol. De plus, si l'on travaille au niveau de l'ADN, la quantification prend en compte des bactéries présentes et non les seules bactéries actives). Par ailleurs, la mesure de la quantité de séquences d'ADN par qPCR ne peut être directement reliée à la quantité de bactéries car la séquence cible peut être présente en plusieurs copies dans une seule bactérie et le nombre de copies peut être variable selon les espèces. Ceci peut-être le cas pour les gènes ribosomiques (Cole and Saintgiron, 1994) et pour des gènes de fonction, par exemple le gène *amoA* impliqué dans la 1<sup>ère</sup> étape de la nitrification (Norton et al., 1996) et le gène *nxrA* impliqué dans la 2<sup>nde</sup> étape de la nitrification (Poly et al., 2008). Cependant, cette méthode permet une estimation rapide et reproductible du nombre de copies de gènes marqueurs pour les communautés fonctionnelles. Nous avons utilisé cette méthode pour quantifier les effectifs de la communauté dénitrifiante grâce au gène *nirK* (Henry et al., 2004) et les effectifs de la communauté nitrifiante grâce au gène *nxrA* (méthode développée au sein de l'équipe par Commeaux et al. (2008). L'analyse phylogénétique réalisée par Henry et al. (2004) a démontré que cette technique permettait effectivement de quantifier les effectifs de bactéries dénitrifiantes non cultivées et était très sensible (détection jusqu'à 10<sup>2</sup> copies par échantillon ; le même seuil de détection étant observé pour *nxrA*).

## **5 Mesure de la structure génétique des communautés bactériennes**

A partir de l'ADN extrait des échantillons de sols et après amplification par PCR de séquences ADN cibles, nous avons mesuré les structures génétiques de la communauté bactérienne, de la communauté bactérienne nitrifiante et dénitrifiante respectivement par les techniques RISA (Ribosomal Intergenic Sequence Analysis) et PCR-DGGE (Denaturing Gel Gradient Electrophoresis). Ces techniques dites « d'empreintes génétiques » permettent de passer outre les biais de cultivabilité mais présentent les mêmes inconvénients que la qPCR en terme de problème de rendement de l'extraction d'ADN et de prise en compte de l'intégralité des bactéries, actives ou non.

### *Technique d'empreinte RISA pour la communauté bactérienne*

La technique RISA (Ribosomal Intergenic Sequence Analysis), a été utilisée pour évaluer la structure génétique de la communauté bactérienne. Elle repose sur un principe de séparation différentielle des séquences ADN de l'intergène entre le 16S et le 23S (amplification par PCR avec des amorces universelles) selon le polymorphisme de taille des

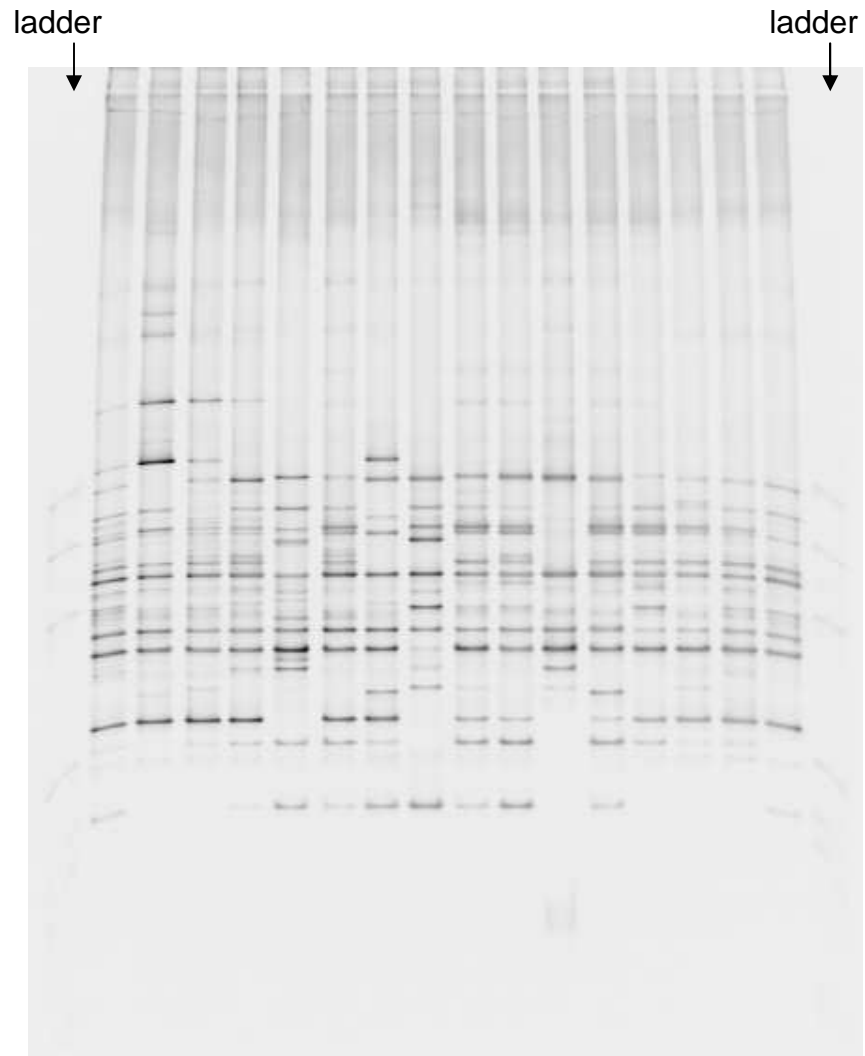


**Figure 27:** principe de la méthode DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) utilisée dans notre étude, pour estimer la structure génétique de la communauté bactérienne nitratante et dénitrifiante.

différentes séquences (Normand et al., 1996; Ranjard et al., 2000) (Fig. 26). Les gels obtenus par cette méthode présentent en moyenne entre 30 et 50 séquences (appelées aussi bandes). La technique « automatisée » (Automated-RISA) où les séquences sont détectées par un séquenceur (grâce à un fluorochrome lié aux amorces) permet elle, de détecter plus de 200 bandes par échantillons. En analysant certains échantillons par les 2 méthodes RISA et A-RISA nous avons obtenu qualitativement les mêmes résultats ; mêmes différences significatives de structure génétique de la communauté bactérienne selon les traitements agronomiques appliqués. Malgré le faible nombre de bandes détectées par RISA, la différence entre les structures génétiques de la communauté bactérienne issues de sols sous différents traitements serait donc détectable à partir des bandes majoritaires observées sur gel.

#### *Technique d’empreinte DGGE pour les communautés bactériennes dénitrifiantes et nitrifiantes*

Les structures génétiques des communautés bactériennes dénitrifiantes, plus précisément réductrices de nitrite, et nitrifiantes ont été déterminées grâce à la migration en DGGE des séquences *nirK* (Liu et al., 2003) et *nxrA* (Poly et al., 2008; Wertz et al., 2008) amplifiées par PCR. Cette technique permet de séparer des séquences ADN de même taille mais de composition en bases différentes. Cette méthode est très discriminante et permet en théorie de différencier des séquences ADN ayant une seule base différente (Muyzer et al., 1993). Cette technique consiste en une séparation des séquences amplifiées sur des gels de polyacrylamide contenant un gradient linéaire de dénaturants de l’ADN. Il s’agit ici de dénaturants chimiques (urée et formamide) dont le gradient de concentration utilisé varie en fonction de la taille des amplifiats à séparer. Les variations de séquences entre les différents amplifiats vont influencer leur dénaturation et par conséquent leur distance de migration électrophorétique : les fragments dénaturés à faible concentration d’agent dénaturants (pauvres en bases GC composées de 3 liaisons hydrogènes contre 2 pour les bases AT) verront leur migration stoppée au début du gel alors que les fragments dénaturés à forte concentration d’agent dénaturants (plus riches en bases GC) verront leur migration se poursuivre plus longtemps. Un « clamp » composé d’une série de bases guanine-cytosine (GC) est ajouté à l’une des amorces pour éviter que les séquences cibles amplifiées soient dénaturées trop rapidement (Fig. 27). Pour l’analyse des structures génétiques des 2 communautés bactériennes nous avons procédé à 2 amplifications PCR successives des séquences cibles. Cette approche est nécessaire car l’amplification directe avec les amorces contenant le « clamp » ne permet pas l’amplification de ces séquences cibles (Wertz et al.,



**Figure 28** : Exemple d'un gel DGGE obtenu pour caractériser la structure génétique de la communauté nitratante à partir du gène *nxrA*.

2008). Comme pour la RISA, les gels obtenus comportent environ 30-50 bandes et sont donc limités dans la détection des séquences minoritaires (un exemple d'un gel DGGE est présenté en Fig. 28).

Les gels obtenus par RISA et DGGE ont ensuite été analysés grâce à un logiciel d'analyse d'image afin de détecter les différences d'intensité relative des bandes de chaque échantillon.

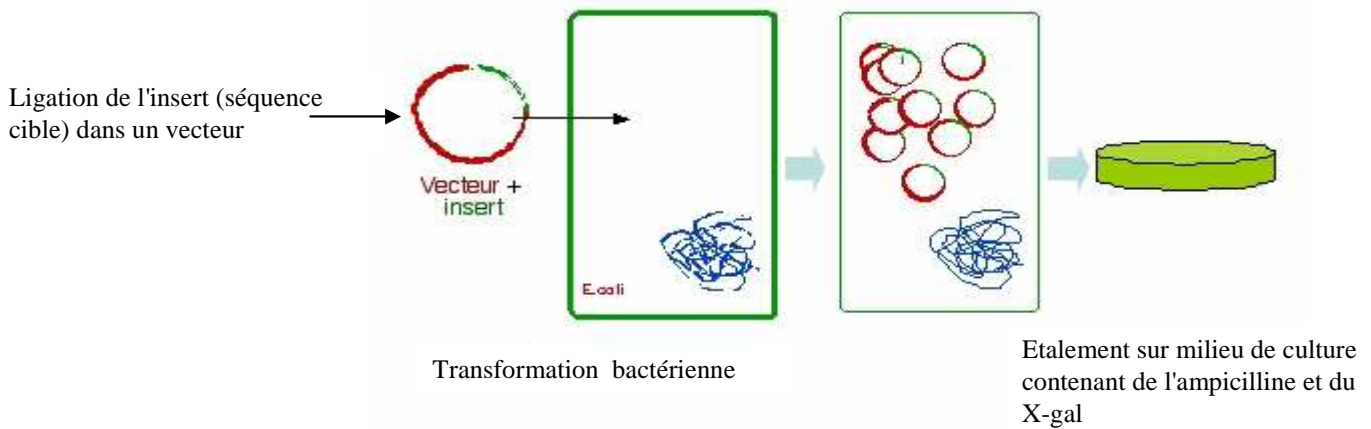
Ces 3 techniques d'empreintes génétiques permettent de traiter relativement rapidement, et relativement facilement, un grand nombre d'échantillons afin de comparer les structures génétiques de différentes communautés bactériennes. A noter que ces techniques ne permettent pas de quantifier directement des populations bactériennes spécifiques puisqu'une bande DGGE ou RISA peut cacher des séquences différentes, et qu'une même bactérie peut générer plusieurs bandes différentes (ci cette bactérie possède plusieurs copies du gène cible ayant des séquences différentes). Donc, ces techniques peuvent difficilement être utilisées pour estimer la diversité (en terme de richesse, mais aussi d'abondance relative) de la communauté bactérienne (mais voir Loisel et al., 2006 pour des tentatives d'utiliser des empreintes génétiques en ce sens). C'est pourquoi, il est possible de compléter les techniques d'empreintes génétiques par des approches plus lourdes mais plus adaptées à l'estimation de la diversité des communautés, comme l'approche de clonage-séquençage.

## **6 Caractérisation de la diversité des communautés par clonage-séquençage**

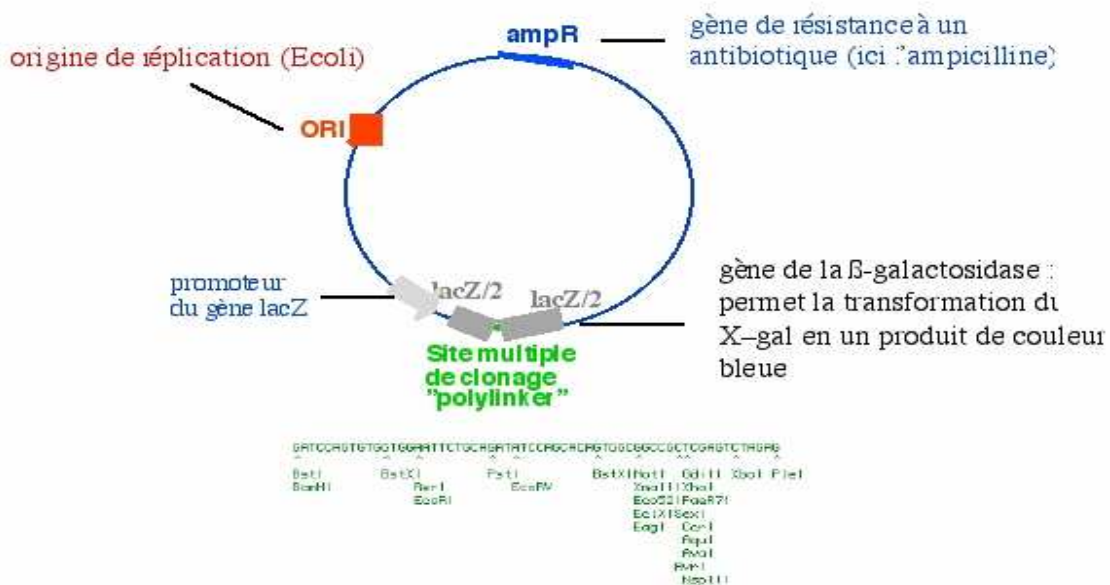
Pour analyser une séquence cible par clonage séquençage, une PCR ciblant le gène d'intérêt est réalisée. Après purification, cette séquence cible d'ADN est insérée dans un vecteur par ligation (Fig. 29). Le mélange de ligation est ensuite mis en présence, dans notre cas, de la bactérie *E. coli* JM109 de façon à ce que le vecteur avec éventuellement l'insert y pénètre pour s'y multiplier (i.e. transformation bactérienne). La ligation puis ensuite la transformation bactérienne ne sont pas efficaces à 100%, c'est à dire que des vecteurs peuvent ne pas posséder d'insert après ligation et des bactéries peuvent ne pas avoir reçu de vecteurs après transformation. Pour sélectionner les bactéries ayant bien reçu le fragment d'intérêt, le vecteur est doté d'un gène de résistance à un antibiotique, l'ampicilline. Seules les bactéries ayant reçu le vecteur seront résistantes à l'ampicilline et pourront se développer. Par ailleurs, le site d'insertion de l'insert est situé à l'intérieur du gène de la  $\beta$ -galactosidase. L'insertion va



## Principe du clonage bactérien A



## STRUCTURE D'UN PLASMIDE DESTINÉ AU CLONAGE BACTÉRIEN B



**Figure 29 :** Principe du clonage d'une séquence cible d'ADN en vue de son séquençage (A). Schéma de la structure du plasmide utilisé pour ce clonage (B). Pour les explications de chaque étape, se référer au texte..

donc couper ce gène qui ne fonctionnera plus. Il est donc possible de distinguer les vecteurs qui ont inséré un fragment d'ADN de ceux qui n'ont pas inséré un tel fragment mais se sont recircularisés à l'aide de la ligase, en testant le fonctionnement de la  $\beta$ -galactosidase (dégradation du X-gal en un produit coloré bleu). Les colonies blanches signalent alors une absence de fonctionnement de l'enzyme et l'insertion d'un vecteur contenant le fragment d'intérêt. Ces colonies sont repiquées dans un milieu spécifique et transmises à des prestataires réalisant le séquençage. Les séquences obtenues ont ensuite été analysées grâce des logiciels spécifiques pour permettre la construction d'arbres phylogénétiques (Bioedit, Seaview, Phylowin).

## **7 Analyses statistiques**

Pour déterminer la significativité des effets des modes de gestion sur les effectifs et les activités bactériennes, nous avons réalisé, pour chaque date, des ANOVA complétées par le test de Fischer. Pour déterminer la significativité des corrélations entre d'une part chaque variable environnementale ou les effectifs, et d'autre part les activités bactériennes, nous avons utilisé le test de Pearson.

Pour les données de structures génétiques des communautés bactériennes, nous avons construit des matrices d'intensité relative des bandes pour chaque échantillon. Le logiciel PRIMER (PRIMER-E Ltd, Plymouth, UK) a été utilisé pour (i) obtenir des matrices de similarité de rang entre échantillons et (ii) construire des « cartes » mettant en valeur la similarité/dissimilarité des structures génétiques des communautés bactériennes par « non-metric multidimensional scaling » MDS (Kruskal and Wish, 1978) (Fig. 30). Les erreurs entre les matrices de similarité de rang et la représentation MDS ont été évaluées grâce à une valeur d'un paramètre appelé « stress ». De faibles valeurs de stress (0 à 0,2) indiquent une bonne représentation par le MDS de l'information contenue dans la matrice de similarité de rang. De fortes valeurs de stress (supérieures à 0,2) indiquent que le MDS ne permet pas une bonne représentation de l'information. Pour chaque date, une analyse de similarité (ANOSIM) a été réalisée pour comparer statistiquement les structures génétiques entre chaque paire de traitements, et une analyse SIMPER (SIMilarity PERcentages) a été utilisée pour calculer le pourcentage de dissimilarité entre les structures génétiques pour chaque paire de traitements.

La corrélation entre les activités bactériennes et les structures génétiques des communautés bactériennes correspondantes a été testée graphiquement et statistiquement (Fig. 30). Tout d'abord, la corrélation a été visualisée en représentant les valeurs d'activité

Matrice d'intensité relative des fragments de la séquence d'ADN cible pour chaque échantillon

Mesures d'une variable environnementale

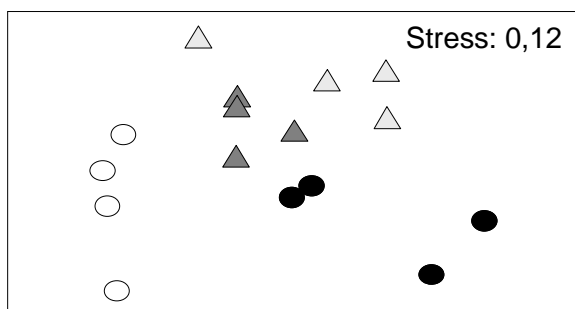
Calcul du pourcentage de dissimilarité entre traitements

Matrice de similarité entre échantillons: coefficient de Bray-Curtis

	PP1	PP2	PP3	PP4	PC2	PC3	PC4
PP1							
PP2	82,83						
PP3	89,859	81,72					
PP4	71,081	78,004	74,451				
PC2	75,294	80,566	70,314	78,218			
PC3	64,5	69,683	59,96	68,203	82,406		
PC4	67,697	73,23	64,736	71,951	83,974	79,66	

Matrice de similarité entre échantillons: distance euclidienne

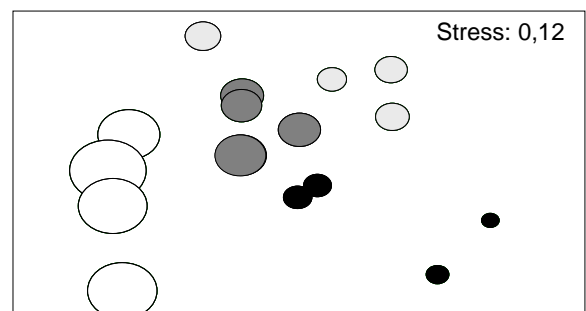
	PP1	PP2	PP3	PP4	PC2	PC3	PC4
PP1							
PP2	11,959						
PP3	17,767	14,219					
PP4	9,1862	10,135	13,9				
PC2	13,668	11,011	10,103	10,057			
PC3	11,079	12,106	12,567	8,3456	6,052		
PC4	12,043	12,738	15,566	10,582	11,779	9,137	



MDS: Multi Dimensional scaling

➤ "Carte" représentant au mieux la similarité entre échantillons

➤ Test de Spearman : relation entre structure génétique et variable environnementale. Représentation sur le MDS de "l'intensité" de la variable environnementale par la taille des disques.



➤ Stress: distorsion entre représentation graphique et réalité

**Figure 30:** Principes des analyses statistiques multivariées utilisées pour analyser la structure génétique des communautés bactériennes et ses relations avec des effectifs, des activités bactériennes et des variables environnementales

avec des disques dont la taille était proportionnelle au niveau d'activité ; ces disques étant positionnés à l'emplacement qu'a chaque échantillon dans le MDS classant les échantillons en fonction de leurs structures génétiques. Deuxièmement, le coefficient de Spearman et le niveau de significativité associé (obtenu par un test de permutation avec 5000 permutations) ont été calculés pour quantifier la corrélation entre les matrices de similarité d'activité et de structures génétiques des communautés bactériennes (Clarke and Ainsworth, 1993).

Enfin, pour déterminer dans quelle mesure les changements d'effectif de la communauté bactérienne dénitrifiante et des variables environnementales expliquaient significativement les changements de l'activité de dénitrification, et plus précisément pour hiérarchiser le pouvoir explicatif de ces différentes variables sur la dénitrification, nous avons réalisé une analyse par GLM (General Linear Model). Cette analyse consiste à évaluer le niveau de significativité et la proportion de variance d'une variable Y telle que l'activité dénitrifiante qui est expliquée par différentes variables explicatives possibles Xi, en fonction de leur ordre d'entrée dans un modèle de type :  $Y = f(X1 ; \text{puis } X2 ; \text{puis } X3 \dots)$ .



## **Chapitre 2**

### **Etude de l'impact de changements de régimes de pâturage sur la structure de la communauté bactérienne de sols prairiaux**



---

## 2<sup>ème</sup> chapitre :

# Etude de l'impact de changements de régimes de pâturage sur la structure de la communauté bactérienne de sols prairiaux

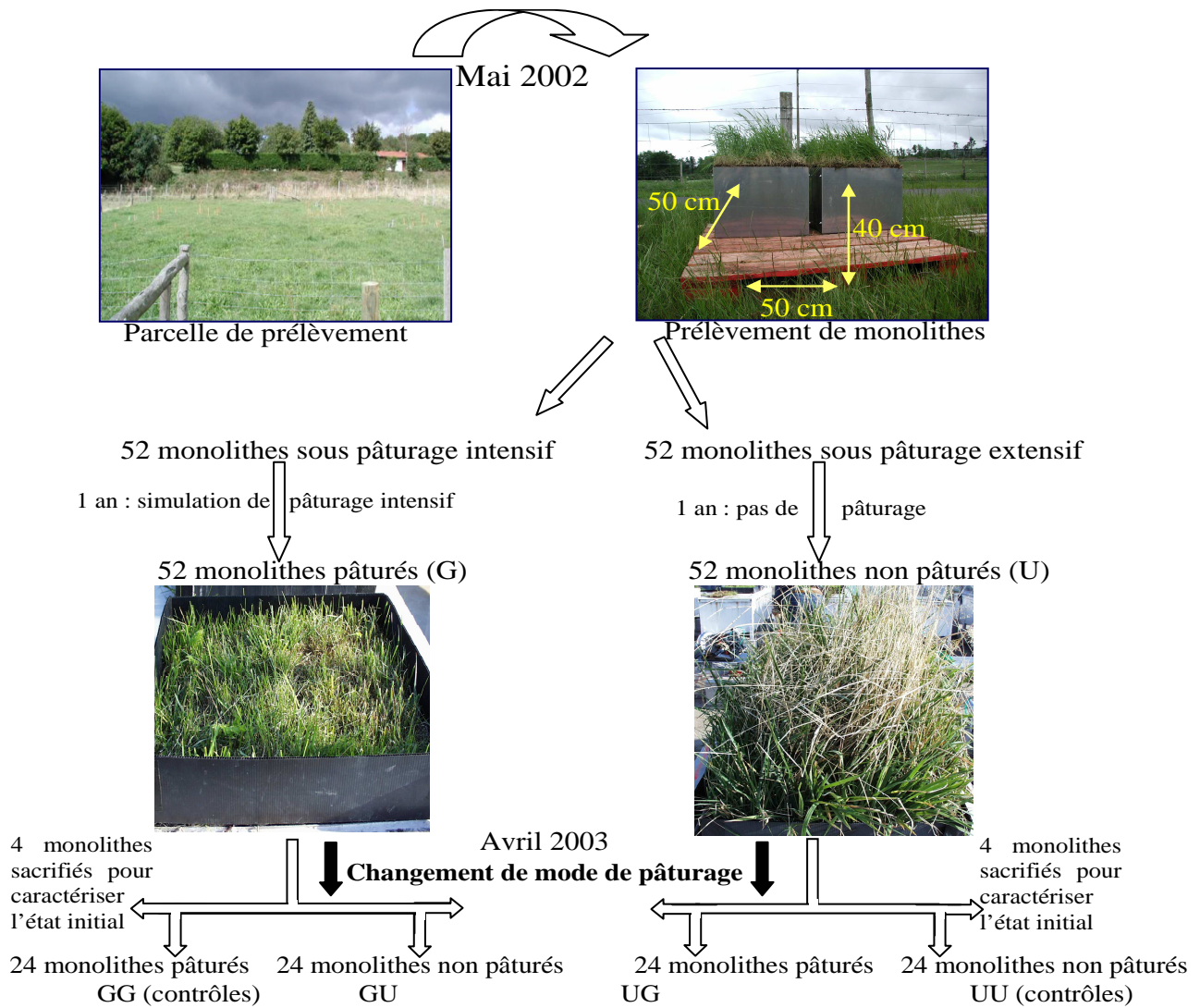
---

### Préambule

Les effets du régime de pâturage sur les communautés bactériennes du sol dans les prairies semi-naturelles ont fait l'objet de plusieurs études. En effet, en agissant de manière directe (par apport de composés azotés, d'excréments, par compaction du sol lié au piétinement animal, par coupe du couvert végétal) et de manière indirecte (exsudation racinaire suite à la coupe des végétaux, modification de composition botanique), le régime de pâturage influence fortement l'écosystème prairial dans son ensemble. Dans le domaine de l'écologie microbienne, plusieurs auteurs ont étudié l'impact de ce mode de gestion sur la diversité des communautés microbiennes. Ainsi, Bardgett et al. (1996) ont pu démontrer qu'arrêter la gestion d'une prairie entraînait une modification du rapport des biomasses champignons : bactéries. Au niveau de la structure de la communauté bactérienne, des différences significatives ont été observées entre les différents modes de gestion appliqués (McCaig et al., 1999; Grayston et al., 2004). Patra et al., (2005, 2006) ont, quant à eux, démontré l'effet de plusieurs années de modes de pâturages contrastés (pâturage intensif ou extensif par ovins dans des prairies non fertilisées) sur 1) des activités microbiennes (le pâturage intensif entraîne une augmentation de la minéralisation du carbone, nitrification et dénitrification) et sur 2) les structures génétiques des communautés eubactériennes, nitrifiantes, dénitrifiantes et fixatrices libres d'azote (les structures génétiques de chaque communauté différant significativement entre les deux modes de pâturage).

Cependant, sous l'effet de contraintes environnementales et socio-économiques, les prairies semi-naturelles voient leur gestion conduite vers la désintensification et l'intensification à l'échelle de quelques années. Malgré la fréquence de ces changements de la gestion des prairies, très peu d'informations ont été collectées sur la réponse des communautés bactériennes du sol dans ce contexte. Notre but a été d'étudier simultanément les effets de l'intensification et l'extensification du mode de pâturage (à partir des mêmes prairies que celles étudiées par Patra et al., 2005; Patra et al., 2006) sur la communauté bactérienne du sol.





**Figure 1** : Schéma de la mise en place du dispositif expérimental (collaboration INRA Clermont-Fd).

De manière complémentaire à ce travail, la réponse de la communauté nitrifiante a été étudiée dans ce même dispositif expérimental (voir annexe 2). Ces travaux ont été initiés en cours de Master, et terminés en début de thèse. L'article présenté dans ce chapitre a été publié dans la revue *Soil Biology & Biochemistry*. L'article présenté en annexe 1 a lui été publié dans la revue *ISME*.

## **Démarche expérimentale**

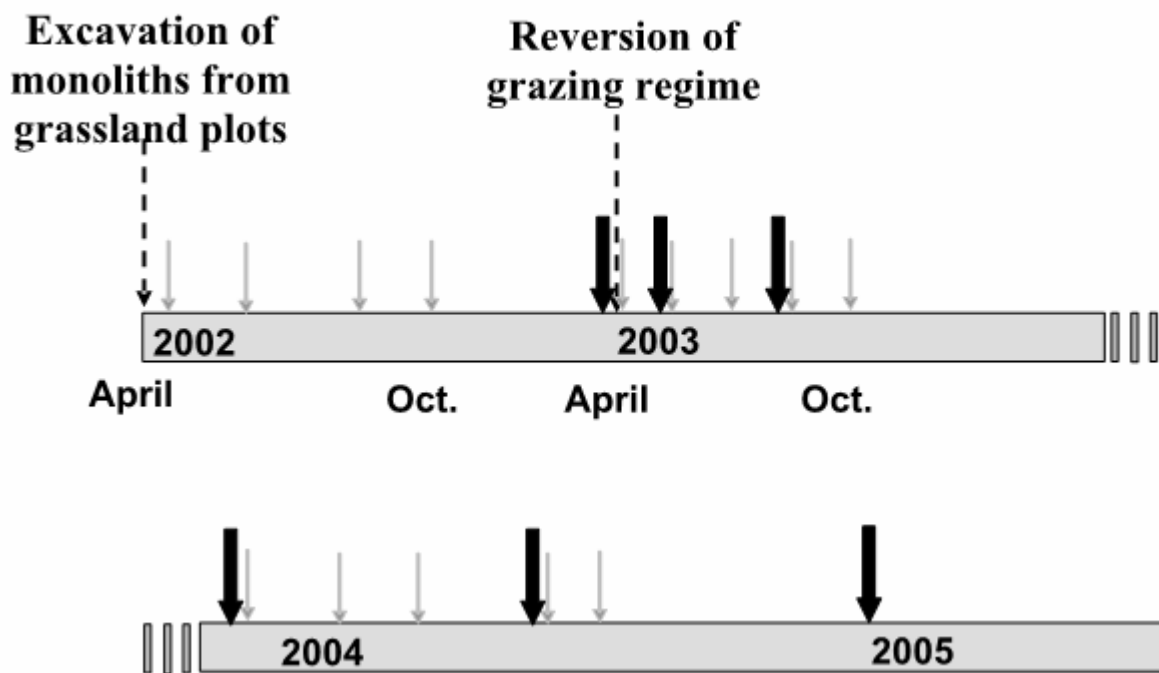
Notre étude s'est déroulée en mésocosmes de sols issus de parcelles de prairies sous pâturage intensif ou extensif afin d'obtenir une meilleure maîtrise des perturbations engendrées par le pâturage (Fig. 1).

L'application du pâturage a consisté à simuler le pâturage sur des sols des prairies initialement pâturées extensivement. L'arrêt du pâturage a consisté à stopper toute gestion sur les sols de prairies initialement pâturées intensivement. Des mésocosmes « contrôles » ont été conservés : (i) maintien d'un pâturage simulé sur les sols de prairies intensives (ii) pas d'apport d'urine et pas de coupe de la végétation sur les sols de prairies extensives. Les prélèvements de sols ont été réalisés 6 fois pendant 2 ans (Fig. 2).

## **Objectifs**

Nos objectifs étaient de :

- tester l'hypothèse que l'application d'un régime de perturbations sur un système initialement non perturbé entraînerait une réponse plus rapide que l'arrêt d'un régime de perturbations sur un système initialement perturbé ;
- analyser dans quelle mesure les changements de la structure de la communauté bactérienne sont expliqués par les changements de composition végétale ou de contenus en carbone organique du sol ;
- tester si les changements du régime de pâturage affectent différemment la structure de la communauté bactérienne selon la micro-localisation des bactéries dans le sol, avec l'hypothèse que les bactéries protégées dans les agrégats stables et donc moins soumises aux modifications des conditions environnementales seront moins affectées que les bactéries situées dans les macropores ou dans des agrégats instables ;
- évaluer si la structure de la communauté bactérienne est principalement déterminée par l'ancien ou le nouveau régime de pâturage deux ans après un changement de mode de pâturage.



**Figure 2 :** Schéma présentant les dates de simulation des évènements de pâturage (flèches grises) et les dates de prélèvements (flèches noires)

## **Principaux résultats et conclusions**

L'application du pâturage a causé un changement de la structure de la communauté bactérienne du sol total en moins de 5 mois alors que les changements ont été observés après 12 mois dans le cas de l'arrêt du pâturage. Nous avons pu observer qu'après l'arrêt du pâturage, les changements de la composition végétale et du stock de carbone organique pouvaient être à l'origine des changements observés sur la structure de la communauté bactérienne. Par contre, après l'application du pâturage, le fait que la structure de la communauté bactérienne ait changé avant que nous observions des changements de la composition végétale et du stock de carbone, suggère que l'apport d'urine et/ou l'impact du carbone labile soi(en)t les principaux facteurs déterminant les changements de la structure bactérienne. Après 12 mois, l'application du pâturage a significativement affecté la structure de la communauté bactérienne issue des fractions interne et externe du sol. A l'inverse, 12 mois après l'arrêt du pâturage, la structure de la communauté bactérienne n'est affectée que dans la fraction externe.

En conclusion, la structure de la communauté bactérienne répond plus rapidement et plus intensément à l'application qu'à l'arrêt du pâturage. Les changements de la composition végétale et du stock de carbone organique peuvent être partiellement responsables des changements observés sur la structure de la communauté bactérienne après l'arrêt du pâturage mais pas après l'application du pâturage. Même après 2 années, la structure de la communauté bactérienne issue du sol total et du sol fractionné reste différente de celle observée dans chaque sol contrôle (pâturé/non pâturé). Ceci démontre que l'ancien et le nouveau modes de pâturage déterminent ensemble la structure de la communauté bactérienne dans les sols soumis à de tels changements de gestion.



**How do grassland management history and bacterial micro-localisation affect  
the response of bacterial community structure to changes in aboveground  
grazing regime ?**

E. ATTARD<sup>1</sup>, V. DEGRANGE<sup>1</sup>, K. KLUMPP<sup>2</sup>, A. RICHAUME<sup>1</sup>, J.F. SOUSSANA<sup>2</sup> and X.  
LE ROUX<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS UMR5557, INRA USC 1196, Ecologie  
Microbienne, Villeurbanne, F-69622, France

<sup>2</sup> Unité d'Agronomie (INRA), Site de Crouel, 234 Avenue du Brézet, F-63100 Clermont  
Ferrand, France

\* Corresponding author: Xavier LE ROUX

Tel: (33) 4 72 43 13 79 Fax: (33) 4 72 43 12 23

E-mail : [leroux@biomserv.univ-lyon1.fr](mailto:leroux@biomserv.univ-lyon1.fr)

*Publié dans Soil Biology and Biochemistry (mai 2008)*



## **Abstract**

In a context of frequent intensification or de-intensification of management in grasslands, a better understanding of how quickly soil microbiota responds to changes in management is required. The kinetics of changes in the structure of the bacterial community (using Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) was studied in grassland mesocosms after changes of aboveground grazing regime, taking into account bacteria micro-localisation by separating the bacteria located inside stable aggregates (inner soil fraction) and the bacteria easily washed out, *i.e.* mainly located in macropores (outer soil fraction). Four treatments were used: (i) control grazed mesocosms, (ii) control ungrazed mesocosms, (iii) application of grazing on previously ungrazed mesocosms, (iv) cessation of grazing on previously grazed mesocosms. Each grazing event was simulated by application of synthetic sheep urine and plant clipping. Application of grazing led to a change in the structure of the whole soil bacterial community within 5 months, whereas changes were observed only 12 months after cessation of grazing. Changes in plant species composition and soil organic carbon content observed after cessation of grazing were found to be possible drivers of the changes in the bacterial community structure. However, after application of grazing, changes of the bacterial community structure occurred prior to changes in plant species composition and soil organic carbon content, suggesting that supply of urine and/or impact of labile carbon were likely the main drivers of changes. After 12 months, the application of grazing significantly affected the bacterial community structure in both inner and outer soil fractions. Conversely, 12 months after cessation of grazing, community structure was affected only for bacteria located in the outer fraction. This study shows that the bacterial community structure responded faster and more deeply after application than after cessation of grazing, and may be driven by different environmental factors between both scenarios. This study also shows that, two years after the changes in grazing regime, the bacterial community structure was determined by both the past and new grazing regimes.

**Key words:** bacterial diversity / herbivory / plant species composition / prairie / Ribosomal Intergenic Spacer Analysis / soil fractionation





## 1. Introduction

In grassland ecosystems, management practices induce disturbance regimes (*i.e.* repeated disturbances in time) that deeply affect the soil system and its microbial component. For instance, tillage (Calderon et al., 2001), mineral fertilisation (McCaig et al., 1999; Clegg et al., 2003; Grayston et al., 2004) and organic fertilisation (Bol et al., 2003; Bittman et al., 2005) have been shown to strongly influence the activity and composition of the soil microbiota. In particular, aboveground grazing regime by cattle or sheep deeply affects C and N cycling mainly *via* urine/dung deposition and sward defoliation. This, in turn, has been shown to affect the composition of soil microbial community on the long term, typically on a few years to decades in fertilised grasslands (Bardgett et al., 1997; 2001; Clegg, 2006) and unfertilised grasslands (Patra et al., 2005; 2006). Actually, demographic and socio-economical constraints often lead to intensification or de-intensification in grazed grasslands over time scales shorter than decades but information on the response of the soil bacterial community in this context is very scarce. For instance, Bardgett et al. (2001) have analysed the response of the structure of the soil bacterial community after cessation of grazing on a long-term (after 5, 10 and 20 years). Conversely, after urine application (which is one aspect of intensification), Rooney et al. (2006) have surveyed the genetic structure of the soil bacterial community on a short term (after 10 and 50 days) in soil microcosms. However, the response of soil bacterial community to both intensification and de-intensification has never been studied during a course of time from short term (a few months) to medium term (a few years). Furthermore, to what extent the bacterial micro-localisation can influence the kinetics of the response of the bacterial community has not been studied yet. This should be taken into account, because depending on their micro-localisation in soil, microorganisms are likely exposed differently to modifications of environmental conditions after a change in management regime (Ranjard and Richaume, 2001).

The aim of our study was to characterise the changes in the genetic structure of the eubacterial community by applying Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA) to DNA extracted from whole soil and from soil fractions corresponding to inner and outer soil fractions. This study was conducted in grassland mesocosms originating from grazed and ungrazed sites, over two years after reciprocal shifts of grazing regime. Four treatments were compared : (i) application of grazing on previously ungrazed mesocosms, (ii) cessation of grazing on previously grazed mesocosms, (iii) control grazed mesocosms, and (iv) control



ungrazed mesocosms. Simulated grazing regime corresponded to plant clipping and application of synthetic sheep urine five times per year. The specific objectives were:

- (1) to test the hypothesis that application of a disturbance regime on a previously undisturbed system would lead to a faster response than cessation of the disturbance regime on a previously disturbed system, as observed in other ecosystems (Garbeva et al., 2006; Salles et al., 2006).
- (2) to analyse to what extent the changes in the bacterial community structure could be explained by the changes in plant species composition and/or soil organic carbon content.
- (3) to test whether the changes in grazing regime affect differently the structure of the bacterial community according to its micro-localisation in soil, assuming that the impact on bacteria in the stable aggregates which are less exposed to modifications in environmental conditions would be lower than that on bacteria located in the macropores.
- (4) to evaluate if bacterial community structure was mainly determined by the present, the past or both present and past disturbance regimes during the 2-year period after changes in grazing regime.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Experimental design**

In May 2002, intact soil blocks with plant cover were sampled in a semi-natural grassland in Theix (45°43'N, 3°1'E, at 870 m a.s.l., France), in plots that had experienced either intensive grazing by sheep (IG, 5 grazing events per year) or light grazing by sheep (LG, one grazing event per year) for 14 years without mineral N fertilization. IG and LG plots experienced the same initial soil characteristics (53% sand, 22% loam, 25% clay; pH 5.6) and the same climate (Le Roux et al., 2003). After 14 years, management led to different total soil organic carbon content in the 0-20cm layer: 4300 gC m<sup>-2</sup> as soil organic matter plus 450 gC m<sup>-2</sup> as root and rhizome biomass in LG plots as compared to 3450 gC m<sup>-2</sup> plus 150 gC m<sup>-2</sup> in IG plots (Klumpp et al., 2007). One hundred and four mesocosms (L: 50cm x w: 50cm x d: 40cm) were placed in a 5-side stainless steel box with drain holes at the bottom (see details in Klumpp et al., 2007). The mesocosms then experienced 2 contrasted grazing regimes during 1 year:

- Grazing (G treatment): plants were clipped to 5 cm above soil surface and synthetic sheep urine supplied 5 times per year for the mesocosms originating from the intensively grazed plot.
- No grazing (ungrazed U treatment) for the other mesocosms.



Soil moisture was monitored and kept around 40% (*ca.* 70% of water holding capacity) by regular watering. Simulation of grazing by cutting corresponded to an annual mean of biomass removal of approximately  $600\text{g C}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{year}^{-1}$ . In order to simulate N returns at grazing, 90 % of the N removed by cutting was replaced a few days later by applying artificial urine. Artificial urine had mean total N content of  $0.7\text{ g N}\cdot\text{l}^{-1}$  and consisted of 80% urea, 10% hippuric acid, 5% allantoin N and 5% creatine N adjusted to pH of 7 with NaOH (Doak, 1952). The annual amount of N application represented  $250\text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ .

In late April 2003, 8 mesocosms (4 G and 4 U) were sacrificed to characterise the genetic structure of the soil microbial community at the beginning of the experiment. At the same date, grazing regime was reversed for half of the remaining mesocosms: 24 grazed mesocosms were submitted to a shift of grazing regime, *i.e.* from grazing to no grazing, GU treatment; and 24 ungrazed mesocosms were submitted to the reciprocal shift from no grazing to grazing, UG treatment. Grazing regime was left unchanged for the 48 other mesocosms: 24 control grazed mesocosms, GG treatment; and 24 ungrazed mesocosms, UU treatment.

## **2.2. Soil sampling**

Soil was sampled just before the change in grazing regime (April 2003), and then 1.5 month (June 2003), 5 months (September 2003), 12 months (April 2004), 17 months (September 2004) and 24 months (April 2005) after the change in grazing regime. Soil was sampled at least 1 month following the last simulated grazing event. At each sampling date, 4 mesocosms were sacrificed for each treatment (4 GG and 4 UU in April 2003; and then 16 mesocosms at each date: 4 GG, 4 UU, 4 GU and 4 UG). The 0-10cm soil layer was sampled on a 10cm x 40cm area in the inner part of each mesocosm. Fresh soil was sieved at 2mm and a sample of 50g was stored at  $-18^{\circ}\text{C}$  for molecular analyses. A 100g sample of fresh soil was used for soil fractionation. The soil organic carbon was measured for the 0-20cm soil layer in the same mesocosms.

## **2.3. Soil fractionation**

At two of the sampling dates (12 and 24 months), soil was fractionated by successive washings (technique first described by Nishio et al. (1968), and presented by Ranjard et al. (1997). 50mL of sterile distilled water was added to each soil sub-sample (equivalent to 10g oven dried). After gentle shaking ( $100\text{ rotations min}^{-1}$  for 1min), soil suspensions were kept still for 1min. Fifteen successive washings were used. The supernatants were pooled and centrifuged at  $10000\text{ rotations min}^{-1}$  for 40min at  $15^{\circ}\text{C}$ . The pellet was resuspended in 20mL

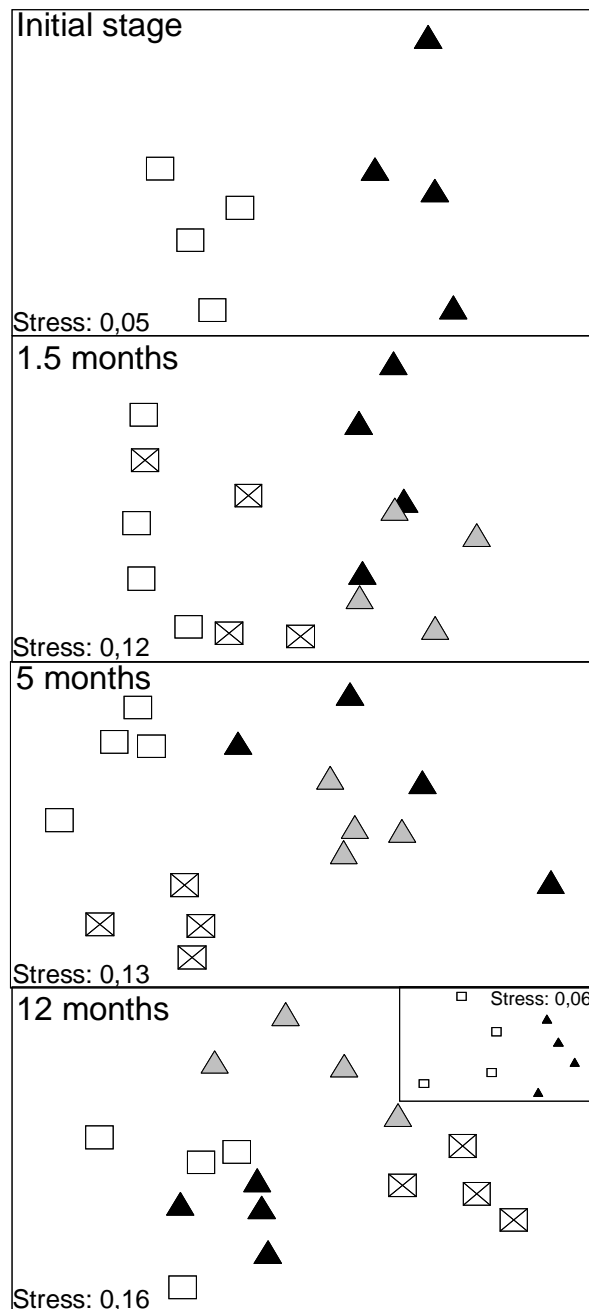


of sterile distilled water and re-centrifuged in the same conditions. The pellet represented bacteria of the outer soil fraction. The soil remaining after the 15 washings contained bacteria of the inner soil fraction. This fractionation technique was previously tested for soils with different structure (crumbly, granular or dispersed) and we used here the energy to be applied for the washings (mass of soil, volume, rotation speed...) and the number of washings to get all easily desorbable bacteria in the outer fraction for strongly aggregated soils. Indeed, as many soils from permanent pasture fields, the soil used in this study was strongly aggregated and the gentle washings allow maintenance of stable microaggregates. Immediately after fractionation, soil DNA was extracted from each soil fraction.

#### **2.4. Genetic structure of the eubacterial community**

For each sample (whole soil samples and soil fractions), DNA was extracted from 0.5g of soil using the FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil (BIO 101<sup>®</sup> Systems, Qbiogene, Carlsbad, CA, USA). The structure of the bacterial community was characterised by Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA) using a method modified from Ranjard et al. (2000). Soil DNA samples were amplified using the primers S-D-Bact-1522-b-S-20 (eubacterial rRNA small subunit, 5'-TGCGGCTGGATCCCCTCCTT-3') and L-D-Bact-132-a-A-18 (eubacterial rRNA large subunit, 5'-CCGGGTTTCCCCATTCGG-3') (Proligo, Paris, France) (Normand et al., 1996). Reaction mixtures (50µl, final concentrations) for PCR contained 5µl of 10X dilution buffer (10mM Tris-HCl, pH=9, 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.10% triton X100, 0.2mg/mL BSA) (Qbiogene, Illkirch, France), 5µL of each dNTP at 200µM (Euromedex, Mundolsheim, France), 2.5µL of each primer at 0.5µM (Proligo, Paris, France), 0.35µL of DNA polymerase at 1.75U (Qbiogene, Illkirch, France) and 5µL of soil DNA at 1.225ng/µL. Amplification was performed in a thermocycler (T-personal 48, Biometra, Goettingen, Germany) beginning by a denaturing phase at 94°C for 5min, followed by 25 cycles (94°C for 1min, 55°C for 1min, and 72°C for 1min) and finishing by an elongation of incomplete products for 7min at 72°C. PCR products were resolved on 5% non-denaturing polyacrylamide-Tris-borate-EDTA gels (Euromedex, Mundolsheim, France). Gels were run at constant temperature (20°C) for 15h at 65V and stained with Sybrgreen (Roche, Meylan, France). The banding patterns were then photographed with Fisher Bioblock system (Illkirch, France) with a UV source. Photographs were analysed with the Gel Compar II software (Applied Maths, Sint-Martens, Belgium) to create a data matrix corresponding to relative intensities of the bands detected for each sample.





**Figure 1:** 2D non metric MDS ordinations of the structure of the bacterial community in whole soil samples just before (initial stage) and 1.5 month, 5 months and 12 months after the change in aboveground grazing regime, for the 4 treatments. ▲ GG: grazed controls □ UU: ungrazed controls; ▲ GU: change from grazed to ungrazed; ⊠ UG: change from ungrazed to grazed. At 12 months, the inset presents the MDS obtained for UU and GG treatments only in order to show that community structure significantly differed between UU and GG, which is not visible on the MDS including all treatments. Results at 17 and 24 months, not shown, were similar to those observed at 12 months.

## **2.5. Total soil organic carbon**

At 1.5, 5, 12, 17 and 24 months after changes in grazing regime, soil samples were air-dried and sieved. Soil organic carbon content and root plus rhizome organic carbon content was determined on a sub-sample of 1mg with an elemental-analyser (CarloErba Instruments, CNS NA 1500 ThermoFinnigan, Milan, Italy).

## **2.6. Plant species composition**

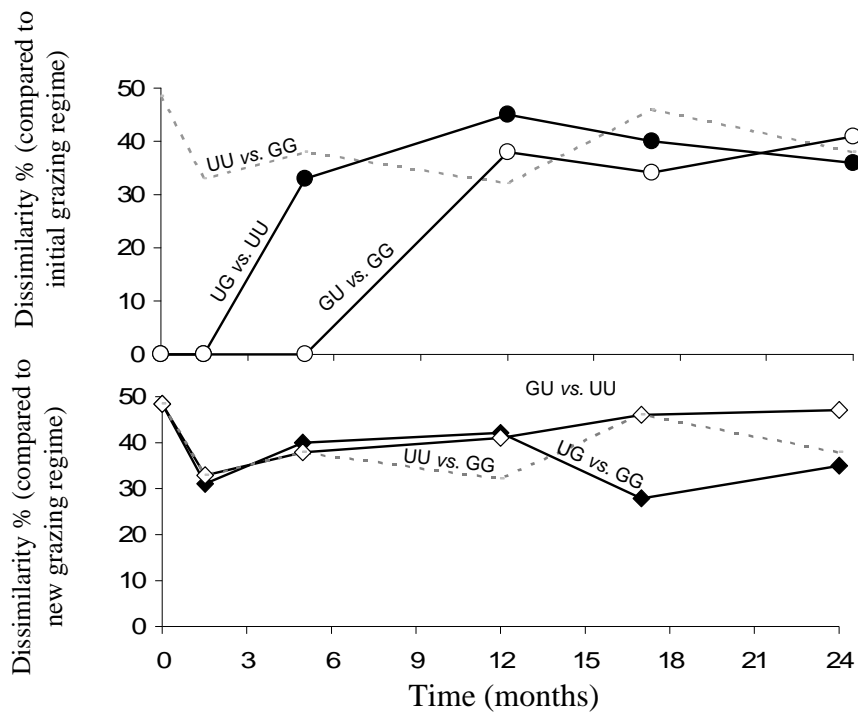
Plant species composition was analysed 4 times during the experimental period (0, 5, 12 and 17 months after changes in grazing regime). The plant species composition of mesocosms was measured according Klumpp et al. (2007) by scoring plant species volume for 16 squares (10x10cm) per mesocosm, giving an estimate of relative abundance of each plant species.

## **2.7. Statistical analyses**

To analyse genetic fingerprints, the intensity and relative position of each DNA band in all lanes (*i.e.* soil samples) were determined according to a reference lane. The total band intensity for each lane was normalised among lanes. With the PRIMER software (PRIMER-E Ltd, Plymouth, UK), rank similarity matrices were computed and used to construct “maps” highlighting the similarity/dissimilarity of the structures of the bacterial community among soil samples by non-metric multidimensional scaling (MDS) (Kruskal and Wish, 1978). Mismatch between rank similarity matrices and MDS representation was assessed by a stress value. Stress values from 0 to 0.2 indicate excellent to moderately good representation of the information on similarity by the MDS, whereas higher stress values indicate that the MDS does not offer a good representation of this information. One-way ANOSIM (ANalysis of SIMilarity) was then performed to test, for each sampling date, whether treatment effect on the bacterial community structure was significant. SIMPER (SIMilarity PERcentages) was also performed to quantify, for each date, the percentage of dissimilarity between the genetic structures for each pair of treatments. To quantify the kinetics of changes in the bacterial community structure after the changes of grazing regime, we surveyed the percentages of dissimilarity between the genetic structures in (i) soils that have experienced the change in grazing regime and (ii) control soils corresponding to the previous grazing regime (*i.e.* UG *versus* UU on the one hand, and GU *versus* GG on the other hand). To quantify the effect of the new grazing regime on the bacterial community structure after change in grazing regime,

**Table 1:** Results ( $p$  values) of the one-way ANOSIM for comparisons of the bacterial community structure in whole soil between each pair of treatments for each sampling date. GG: Grazed control; UU: Ungrazed control; GU: Change from grazed to ungrazed; UG: Change from ungrazed to grazed. \*: Significant at the  $p = 0.05$  level. NS: not significant.

	Time after change in grazing regime (months)					
	0	1.5	5	12	17	24
GG vs. UU	*	*	*	*	*	*
GU vs. GG	-	NS	NS	*	*	*
UG vs. UU	-	NS	*	*	*	*
GU vs. UU	-	*	*	*	*	*
UG vs. GG	-	*	*	*	*	*
GU vs. UG	-	*	*	*	*	*



**Figure 2:** Temporal changes in the dissimilarity percentages between the bacterial community structures for (top) mesocosms submitted to a change in aboveground grazing regime and control ones submitted to the past grazing regime (●:UG versus UU treatments; and○ :GU versus GG treatments), and (bottom) mesocosms submitted to a change in grazing regime versus control ones submitted to the new grazing regime (*i.e.*◆ UG versus GG treatments; and ◇ GU versus UU treatments). The dissimilarity percentages between the 2 controls (GG versus UU treatments) are presented for comparison.

we surveyed the percentages of dissimilarity between the genetic structures in (i) soils that have experienced the change in grazing regime and (ii) control soils corresponding to the new grazing regime (*i.e.* UG *versus* GG on the one hand, and GU *versus* UU on the other hand). A similar analysis was performed to evaluate the effect of the change in grazing regime on plant species composition.

### **3. Results**

#### **3.1. Effects of changes in grazing regime on the bacterial community structure in whole soil**

Both the effects of aboveground grazing regime and sampling date on the bacterial community structure were significant and of the same magnitude. For sake of legibility, comparisons of the genetic structures of the bacterial community are presented date by date (Fig. 1). At each date, 50% of the total grazing-induced dissimilarity between the structures of the bacterial community were due to 8 to 10 bands. Four bands always appeared to participate to the effect of changes in grazing regime, corresponding to intergenic sequence lengths of around 530, 650, 680 and 810 bp.

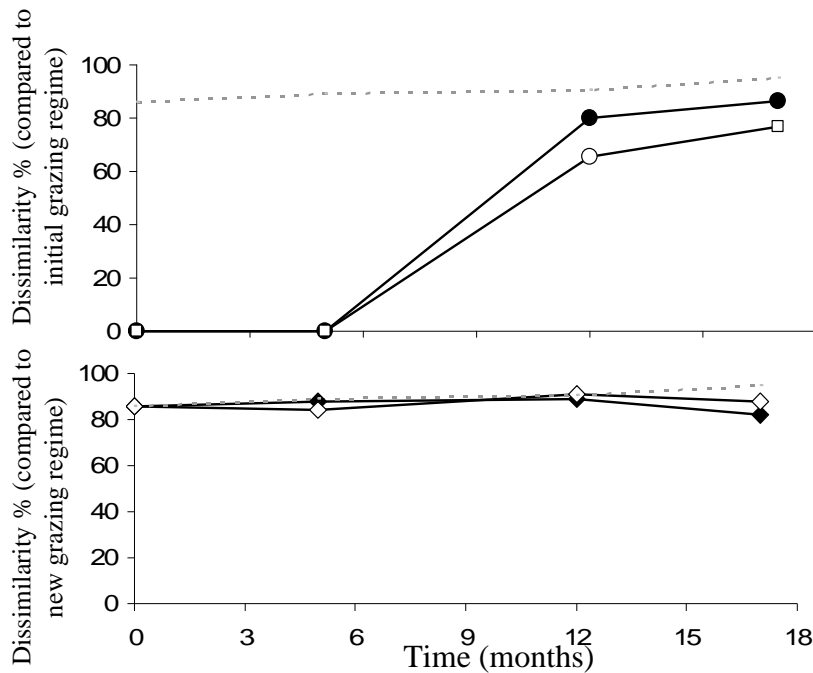
For each sampling date, the bacterial community structure significantly differed between GG and UU control mesocosms (Tab. 1; Fig. 1). Application of grazing led to a change in the bacterial community structure within 5 months (Tab. 1; Fig. 1). At this date and onwards, the dissimilarity percentages between UG and UU treatments reached values close to those observed between control treatments UU and GG (Fig. 2). In contrast, cessation of grazing did not lead to any significant change in the bacterial community structure over the first 5 months (Tab. 1; Fig. 1). After 12 months, the dissimilarity percentages between GU and GG treatments reached values close to those observed between control treatments UU and GG (Fig. 2). During all the time of the experiment, the structure of the bacterial community for soils submitted to change in grazing regime, namely UG and GU treatments, did not resemble that characterized for control soils experiencing the new grazing regime, respectively GG and UU soils (Tab. 1; Fig. 2).

#### **3.2. Effects of change in grazing regime on plant species composition and total soil organic carbon content**

Within the first 5 months, both application and cessation of grazing had no effect on plant species composition (Fig. 3). After 12 months, the percentage of dissimilarity in plant

**Table 2:** Results ( $p$  values) of the one-way ANOSIM for comparisons of the bacterial community structure in the inner and outer soil fractions between treatments 12 and 24 months after the change in grazing regime. Abbreviations are as in Table 1. \* : Significant at the  $p = 0.05$  level.

	Time after change in grazing regime (months)			
	12	12	24	24
	inner fraction	outer fraction	inner fraction	outer fraction
GG vs. UU	*	*	*	*
GU vs. GG	<i>NS</i>	*	*	*
UG vs. UU	*	*	*	*
GU vs. UU	*	*	*	*
UG vs. GG	*	*	*	*
GU vs. UG	*	*	*	*



**Figure 3:** Dissimilarity percentages between (top) the plant species compositions in mesocosms submitted to a change in grazing regime and control ones submitted to the past grazing regime (●:UG versus UU treatments; and ○:GU versus GG treatments), and (bottom) the plant species compositions in mesocosms submitted to change in grazing regime and control ones submitted to the new grazing regime (◆:UG versus GG treatments ; and ◇: GU versus UU treatments).

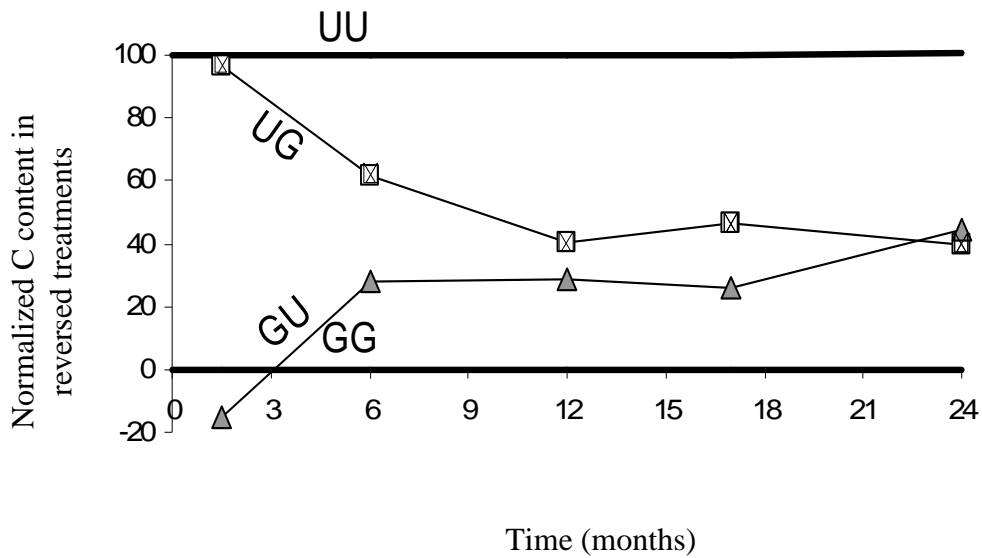
species compositions reached respectively 80% and 65% between UG and UU mesocosms, and GU and GG mesocosms. The dissimilarity percentages between the mesocosms submitted to the new grazing regime (*i.e.* UG *versus* GG and GU *versus* UU) was close to 85% throughout the experiment (Fig. 3).

Total soil organic carbon content significantly differed between UU and GG treatments at all dates (only marginally at the beginning of the experiment) and was always higher in UU than in GG treatments. 12 months after grazing application, a strong decrease in total soil organic carbon content was observed (Fig. 4). In contrast, following cessation of grazing, a moderate increase in total soil organic carbon content was observed (Fig. 4). The amplitude of changes in total soil organic matter was mainly due to changes in the amount of roots, rhizomes and fresh belowground litter. For instance, in the case of application of grazing, soil organic matter from roots and rhizomes in the 0-20cm layer decreased from 450 g C.m<sup>-2</sup> to 285 g C.m<sup>-2</sup> within one year after changes in grazing regime. Conversely, in the case of cessation of grazing, soil organic matter from roots and rhizomes increased from 150 g C.m<sup>-2</sup> to 300 g C.m<sup>-2</sup> within one year after changes in grazing regime. Changes in fresh belowground litter (particulate organic matter) further explained the rapid changes in total soil organic C content observed. More information on the dynamics of soil organic carbon pools is provided by Klumpp et al. (2007).

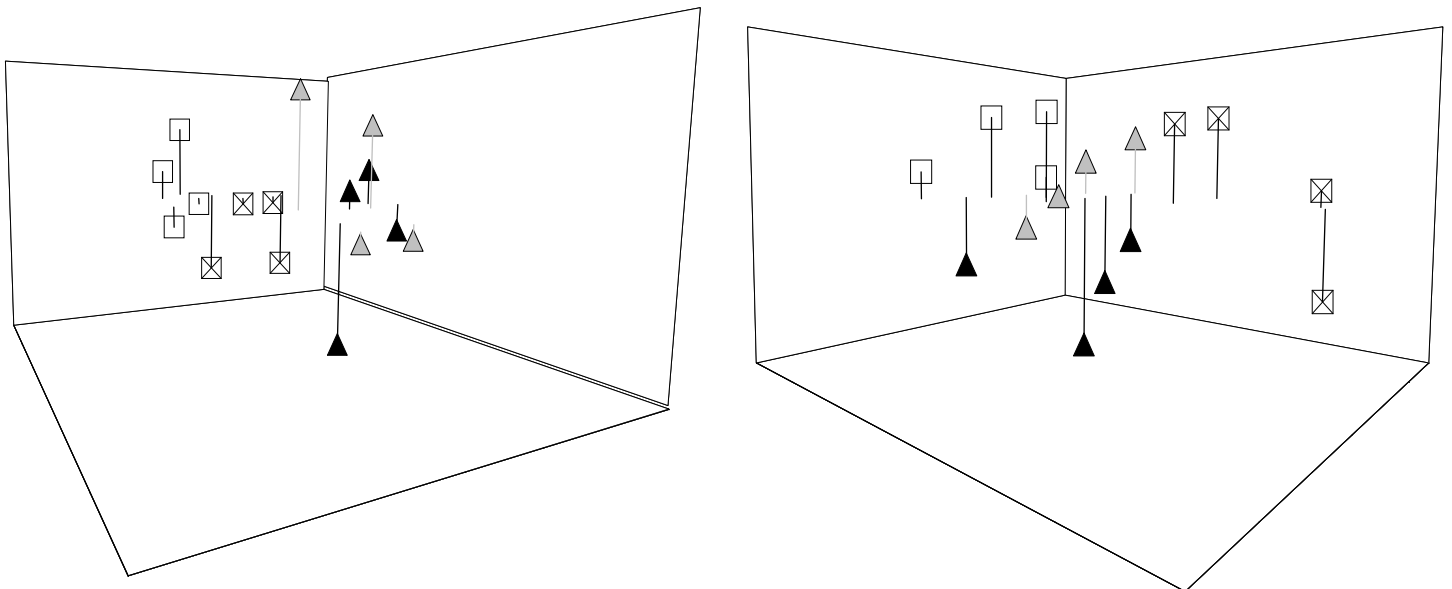
### **3.3 Effects of change in grazing regime on the bacterial community structure in soil fractions**

The genetic structure of the bacterial community of each soil fraction (inner and outer) differed significantly between the UU and GG control treatments at 12 and 24 months (Tab. 2 and Fig. 5). After the application of grazing, the bacterial community structure in the inner and outer soil fractions differed significantly between the UG and UU treatments, both at 12 months and 24 months. In contrast, 12 months after cessation of grazing, the bacterial community structure in the outer soil fraction significantly differed between UG and UU treatments but did not significantly differ between these treatments in the inner soil fraction. After 24 months, cessation of grazing led to a significant change in the bacterial community structure in both soil fractions. After 24 months and for both soil fractions, the structure of the bacterial community still differed between UG and GG and between GU and UU treatments.

## **4. Discussion**



**Figure 4:** Temporal changes in total soil organic carbon content in mesocosms submitted either to application of grazing (  $\boxtimes$ : UG) or cessation of grazing (  $\blacktriangle$ : GU). For each date, values were normalised using total soil organic carbon in ungrazed mesocosms (typically  $4800 \text{ gC m}^{-2}$  in the 0-20cm layer) as the upper boundary and soil organic carbon in grazed mesocosms (typically  $3600 \text{ gC m}^{-2}$ ) as the lower boundary. Total soil organic carbon content includes roots, rhizomes and particular (fresh) organic matter compartments that were the most affected by changes in grazing regime (see text).



**Figure 5:** 3D non metric MDS ordinations of the bacterial community structure in the inner (A) and (B) outer fractions of soils sampled 12 months after the change in aboveground grazing regime, for the 4 treatments. Symbols are as in Fig. 1.

#### **4.1. Does the kinetics of changes in the bacterial community differ between application and cessation of grazing?**

In our study, the application of grazing led to a significant change in the bacterial community structure within 5 months. Other studies on the effects of urine supply on previously extensive grasslands (Rooney et al., 2006; Williams et al., 2000) reported a change in bacterial community structure within 1.5 months following the addition of respectively 500 and 800 kg N. ha<sup>-1</sup>. In our study, annual urine input was equivalent to 250 kg N. ha<sup>-1</sup>, which is within the range of 200 to 500 kg N. ha<sup>-1</sup>.y<sup>-1</sup> generally reported for field conditions (Bol et al., 2004; Lovell and Jarvis, 1996; Nunan et al., 2006; Rooney et al., 2006; Williams et al., 2000). This likely explained the slower change in bacterial community structure than those previously reported for higher urine supply rate (Nunan et al., 2006; Williams et al., 2000).

Our results show that the application of a disturbance regime (grazing events) on a previously undisturbed system led to a faster response (5 months) than the cessation of the disturbance regime on a previously disturbed system (12 months). This is consistent with the findings of Salles et al. (2006) reporting a faster change in the *Burkholderia* community structure after conversion of grassland into arable land (*i.e.* tillage applied on a previously untilled system) than after the reverse conversion of arable land into grassland. Similarly, nitrifier community structure has been found to change more rapidly after application than cessation of disturbance regime associated to grassland management (Le Roux et al., 2007).

In our study, the effects of the changes of grazing regime on the bacterial community structure were strong, dissimilarity percentages between UG-UU and GU-GG treatments being as intense as those between control soils during the second year of the experiment. With a single urine supply of 500 kg N. ha<sup>-1</sup>, Nunan et al. (2006) reported a significant but weak effect on the bacterial community structure. Our N supply represented half the amount applied by Nunan et al. (2006), indicating that repeated application of urine could have a deeper effect than point application and/or that other aspects of grazing disturbance presumably affected the bacterial community structure.

#### **4.2. Do changes in plant species composition and soil organic carbon content explain the modification of the bacterial community structure?**

The simulated aboveground grazing regime was associated to important disturbances and changes in environmental conditions in soil. These changes encompass direct effects of supply of urine that affects soil nitrogen availability and soil pH (Petersen et al., 2004a). Grazing regime also have indirect effects on soil environmental conditions *via* changes in





plant species composition and *via* plant clipping that can induce strong changes in root functioning such as input of labile carbon by exudation and changed nitrogen uptake (Paterson and Sim, 1999). Urine supply (Petersen et al., 2004b; Rooney et al., 2006), changes in root exudation (Baudoin et al., 2003; Weisskopf et al., 2005), identity of plant species (Grayston et al., 1998; Kowalchuk et al., 2002; Patra et al., 2006), and soil organic carbon pools (Cookson et al., 2007; Fierer et al., 2003) have been shown to influence the bacterial community structure. Therefore, all these direct and indirect factors could, a priori, explain the observed changes in bacterial community structure following changes in grazing regime in our study. During the first year after cessation of grazing, the observed changes in the bacterial community structure were concurrent to changes in plant species composition and soil organic carbon content. Consequently, both changes in plant species composition and soil organic carbon content could be, at least partly, responsible for the observed changes in the structure of the bacterial community after cessation of grazing. In contrast, 5 months after application of grazing, no effect was observed on plant species composition and only a marginal effect was observed on soil organic carbon content, whereas the effect on the bacterial community structure was strong. Therefore, after application of grazing, changes in the bacterial community structure were likely mainly explained by effects of urine supply and possible changes in root exudation from the defoliated sward.

#### **4.3. Does the micro-localisation of bacteria influence their response to change in grazing regime?**

Changes in environmental conditions induced by changes in disturbance regime often strongly differ among the different micro-habitats in the soil (Ranjard et al., 2000; Mummey and Stahl, 2004). Indeed, bacteria of the outer soil fraction, located in the macroporosity, in unstable aggregates, and at the surface of aggregates, are likely more exposed to mild changes in environmental conditions than bacteria of the inner soil fraction, located in the stable aggregates (Ranjard and Richaume, 2001). In our study, 1 year after the change in grazing regime, the effects of both application and cessation of grazing on the bacterial community structure were significant in the outer soil fraction (consistently with results obtained in whole soil). However, in the inner soil fraction, the effects were significant after application of grazing but not after cessation of grazing. Cessation of grazing likely induced less intense changes in environmental conditions than application of grazing (only moderate changes in soil organic carbon content and root exudation). In addition, the turn-over rate of organic matter in the inner soil fraction is known to be slower than in outer fraction (Six et al., 2002).



Consequently, the bacterial community located in the inner soil fraction was exposed to slower and weaker changes in environmental conditions than in the outer fraction after cessation of grazing. A similar effect of bacterial micro-localisation has been reported by Ranjard et al. (2000), who showed a higher impact of mercury supply on bacteria in the outer than inner fractions of soil.

Two years after application and cessation of grazing, the genetic structure of the bacterial community in both the inner and outer soil fractions significantly differed from that in the corresponding soil fractions of, respectively, control grazed and ungrazed soils. This demonstrates that after changes in management, the genetic structure of the bacterial community was not essentially determined by the new grazing regime, but rather by both the past and the new management regimes. Similarly, 4 and 7 years after changes in the management of agrosystems, Garbeva et al. (2006) and Buckley and Schmidt (2001) showed that the bacterial community structure differed from that in soil of control systems submitted to the new management.

In conclusion, application of grazing led to a faster (within 5 months) and stronger (both outer and inner fractions affected after 12 months) effect on the bacterial community structure than cessation of grazing. Changes in plant species composition and soil organic carbon content could be partly responsible for the observed changes of the bacterial community structure after cessation of grazing, but not after application of grazing. Even after 2 years, the bacterial community structure in whole soil and soil fractions differed from that observed in each control soil, which showed that both past and new management regimes determine the structure of the bacterial community in soil submitted to changes of management regime.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the National Institute of Agronomic Research (Projet Innovant INRA) and by the French Programme ECCO-PNBC “Géotraits”. We thank F. Teyssonneyre for help during sampling periods.



**Appendix 1:** View of the mesocosms, and presentation of vegetation status in an ungrazed mesocosm and just after a simulated grazing event in a grazed mesocosm.

## References

- Bardgett, R.D., Leemans, D.K., Cook, R., Hobbs, P.J., 1997. Seasonality of the soil biota of grazed and ungrazed hill grasslands. *Soil Biology & Biochemistry* 29, 1285-1294.
- Bardgett, R.D., Jones, A.C., Jones, D.L., Kemmitt, S.J., Cook, R., Hobbs, P.J., 2001. Soil microbial community patterns related to the history and intensity of grazing in sub-montane ecosystems. *Soil Biology & Biochemistry* 33, 1653-1664.
- Baudoin, E., Benizri, E., Guckert, A., 2003. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* 35, 1183-1192.
- Bittman, S., Forge, T.A., Kowalenko, C.G., 2005. Responses of the bacterial and fungal biomass in a grassland soil to multi-year applications of dairy manure slurry and fertilizer. *Soil Biology & Biochemistry* 37, 613-623.
- Bol, R., Kandeler, E., Amelung, W., Glaser, B., Marx, M.C., Preedy, N., Lorenz, K., 2003. Short-term effects of dairy slurry amendment on carbon sequestration and enzyme activities in a temperate grassland. *Soil Biology & Biochemistry* 35, 1411-1421.
- Bol, R., Petersen, S.O., Christofides, C., Dittert, K., Hansens, M.N., 2004. Short-term N<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> fluxes, and N/C transfers in a danish grass-clover pasture after simulated urine deposition in autumn. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* 167, 568-576.
- Buckley, D.H., Schmidt, T.M., 2001. The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microbial Ecology* 42, 11-21.
- Calderon, F.J., Jackson, L.E., Scow, K.M., Rolston, D.E., 2001. Short-term dynamics of nitrogen, microbial activity, and phospholipid fatty acids after tillage. *Soil Science Society of America Journal* 65, 118-126.
- Clegg, C.D., Lovell, R.D.L., Hobbs, P.J., 2003. The impact of grassland management regime on the community structure of selected bacterial groups in soils. *FEMS Microbiology Ecology* 43, 263-270.
- Clegg, C.D., 2006. Impact of cattle grazing and inorganic fertiliser additions to managed grasslands on the microbial community composition of soils. *Applied Soil Ecology* 31, 73-82.
- Cookson, W.R., Osman, M., Marschner, P., Abaye, D.A., Clark, I., Murphy, D.V., Stockdale, E.A., Watson, C.A., 2007. Controls on soil nitrogen cycling and microbial community



- composition across land use and incubation temperature. *Soil Biology & Biochemistry* 39, 744-756.
- Doak, B.W., 1952. Some chemical changes in the nitrogenous constituents of urine when voided on pasture. *Journal of Agricultural Science* 42, 162-171.
- Fierer, N., Schimel, J.P., Holden, P.A., 2003. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biology & Biochemistry* 35, 167-176.
- Garbeva, P., Postma, J., van Veen, J.A., van Elsas, J.D., 2006. Effect of above-ground plant species on soil microbial community structure and its impact on suppression of *Rhizoctonia solani* AG3. *Environmental Microbiology* 8, 233-246.
- Grayston, S.J., Wang, S.Q., Campbell, C.D., Edwards, A.C., 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* 30, 369-378.
- Grayston, S.J., Campbell, C.D., Bardgett, R.D., Mawdsley, J.L., Clegg, C.D., Ritz, K., Griffiths, B.S., Rodwell, J.S., Edwards, S.J., Davies, W.J., 2004. Assessing shifts in microbial community structure across a range of grasslands of differing management intensity using CLPP, PLFA and community DNA techniques. *Applied Soil Ecology* 25, 63-84.
- Klumpp, K., Soussana, J.F., Falcimagne, R., 2007. Effects of past and current disturbance on carbon cycling in grassland mesocosms. *Agriculture Ecosystems & Environment* 121, 59-73.
- Kowalchuk, G.A., Buma, D.S., de Boer, W., Klinkhamer, P.G.L., van Veen, J.A., 2002. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 81, 509-520.
- Kruskal, J.B., Wish, M., 1978. *Multidimensional scaling*, Beverley Hills, California.
- Le Roux, X., Bardy, M., Loiseau, P., Louault, F., 2003. Stimulation of soil nitrification and denitrification by grazing in grasslands: Do changes in plant species composition matter? *Oecologia* 137, 417-425.
- Le Roux, X., Poly, F., Leterme, P., Commeaux, C., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schloter, M., Attard, E., Klumpp, K. 2007. Effects of aboveground grazing regime on coupling among nitrifier activity, abundance and community structure. *ISME Journal* (in press) doi:10.1038/ismej.2007.109.
- Lovell, R.D., Jarvis, S.C., 1996. Effects of urine on soil microbial biomass, methanogenesis, nitrification and denitrification in grassland soils. *Plant and Soil* 186, 265-273.





- McCaig, A.E., Glover, L.A., Prosser, J.I., 1999. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 1721-1730.
- Mummey, D.L., Stahl, P.D., 2004. Analysis of soil whole- and inner-microaggregate bacterial communities. *Microbial Ecology* 48, 41-50.
- Nishio, M., Hattori, T. and C. Furusaka. (1968) The growth of bacteria in sterilized soil aggregates. *Rep. Inst. Agr. Res. Tohoku Univ.* 19, 37-43.
- Normand P., X. Nesme, M. Neyra and P. Simonet. (1996) ITS analysis of prokaryotes. *Molecular microbial ecology manual*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands., pp.1-12.
- Nunan, N., Singh, B., Reid, E., Ord, B., Papert, A., Squires, J., Prosser, J.I., Wheatley, R.E., McNicol, J., Millard, P., 2006. Sheep-urine-induced changes in soil microbial community structure. *FEMS Microbiology Ecology* 56, 310-320.
- Paterson, E., Sim, A., 1999. Rhizodeposition and C-partitioning of *Lolium perenne* in axenic culture affected by nitrogen supply and defoliation. *Plant and Soil* 216, 155-164.
- Patra, A.K., Abbadie, L., Clays-Josserand, A., Degrange, V., Grayston, S.J., Loiseau, P., Louault, F., Mahmood, S., Nazaret, S., Philippot, L., Poly, E., Prosser, J.I., Richaume, A., Le Roux, X., 2005. Effects of grazing on microbial functional groups involved in soil N dynamics. *Ecological Monographs* 75, 65-80.
- Patra, A.K., Abbadie, L., Clays-Josserand, A., Degrange, V., Grayston, S.J., Guillaumaud, N., Loiseau, P., Louault, F., Mahmood, S., Nazaret, S., Philippot, L., Poly, F., Prosser, J.I., Le Roux, X., 2006. Effects of management regime and plant species on the enzyme activity and genetic structure of N-fixing, denitrifying and nitrifying bacterial communities in grassland soils. *Environmental Microbiology* 8, 1005-1016.
- Petersen, S.O., Stamatiadis, S., Christofides, C., 2004a. Short-term nitrous oxide emissions from pasture soil as influenced by urea level and soil nitrate. *Plant and Soil* 267, 117-127.
- Petersen, S.O., Roslev, P., Bol, R., 2004b. Dynamics of a pasture soil microbial community after deposition of cattle urine amended with [C-13]urea. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 6363-6369.
- Ranjard, L., Richaume, A., Jocteur-Monrozier, L., Nazaret, S., 1997. Response of soil bacteria to Hg(II) in relation to soil characteristics and cell location. *FEMS Microbiology Ecology* 24, 321-331.



- Ranjard, L., Nazaret, S., Gourbiere, F., Thioulouse, J., Linet, P., Richaume, A., 2000. A soil microscale study to reveal the heterogeneity of Hg(II) impact on indigenous bacteria by quantification of adapted phenotypes and analysis of community DNA fingerprints. *FEMS Microbiology Ecology* 31, 107-115.
- Ranjard, L., Richaume, A., 2001. Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Research in Microbiology* 152, 707-716.
- Rooney, D., Kennedy, N., Deering, L., Gleeson, D., Clipson, N., 2006. Effect of sheep urine deposition on the bacterial community structure in an acidic upland grassland soil. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 7231-7237.
- Salles, J.F., van Elsas, J.D., van Veen, J.A., 2006. Effect of agricultural management regime on *Burkholderia* community structure in soil. *Microbial Ecology* 52, 267-279.
- Six, J., Feller, C., Denef, K., Ogle, S.M., Sa, J.C.D., Albrecht, A., 2002. Soil organic matter, biota and aggregation in temperate and tropical soils - effects of no-tillage. *Agronomie* 22, 755-775.
- Weisskopf, L., Fromin, N., Tomasi, N., Aragno, M., Martinoia, E., 2005. Secretion activity of white lupin's cluster roots influences bacterial abundance, function and community structure. *Plant and Soil* 268, 181-194.
- Williams, B.L., Grayston, S.J., Reid, E.J., 2000. Influence of synthetic sheep urine on the microbial biomass, activity and community structure in two pastures in the scottish uplands. *Plant and Soil* 225, 175-185.



## **Chapitre 3**

**Etude de l'impact de changements de mode de travail du sol sur l'activité, l'abondance et structure de la communauté nitrifiante dans des sols cultivés**



---

## 3<sup>ème</sup> chapitre : Etude de l'impact de changements de mode de travail du sol sur l'activité, l'abondance et structure de la communauté nitratante dans des sols cultivés

---

### Préambule

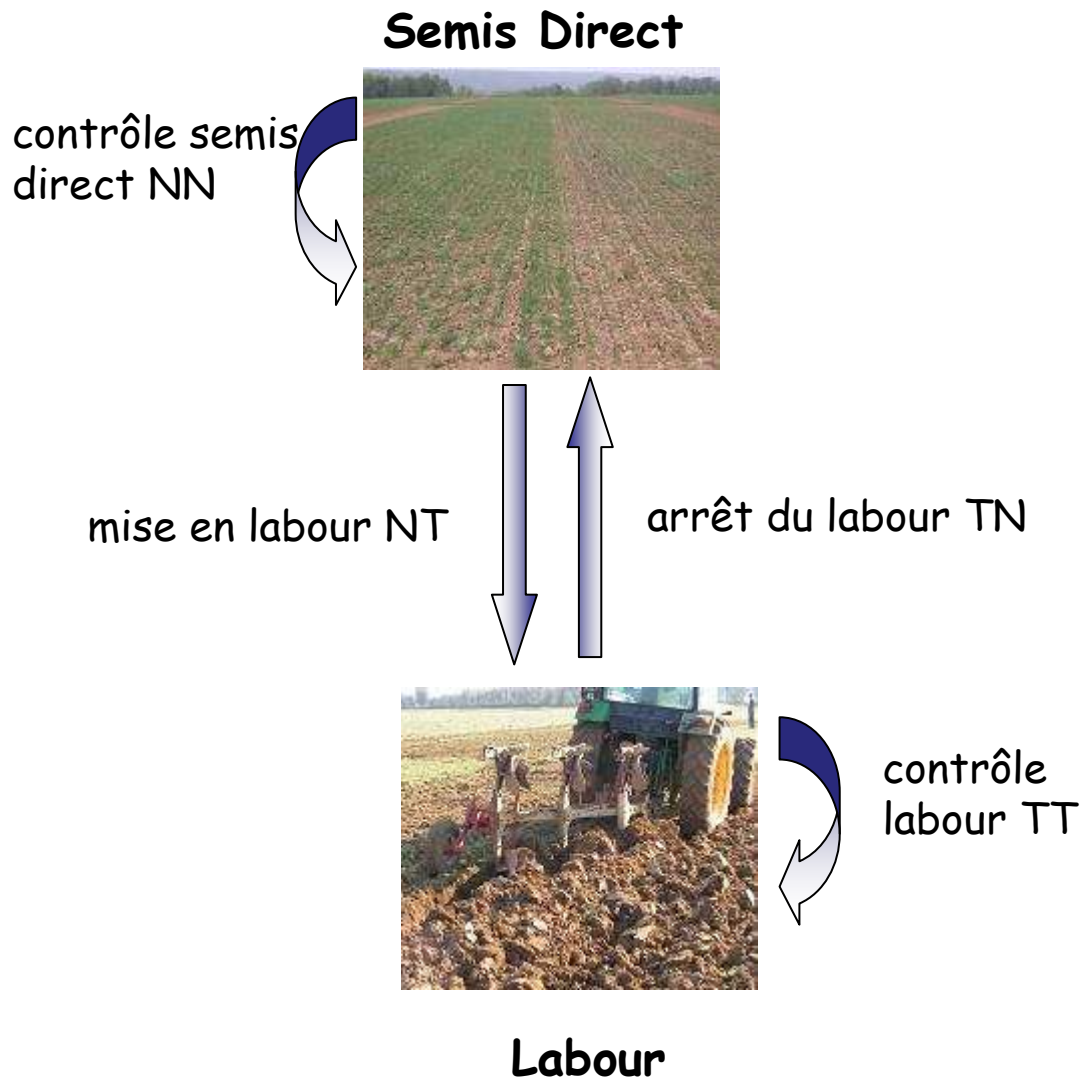
Jusqu'à présent, très peu de connaissances ont été recueillies quant à l'écologie des bactéries nitrifiantes (ou NOB pour « Nitrite-Oxidizing Bacteria ») dans les sols, et leur réponse face à diverses perturbations comme celles engendrées par les pratiques agricoles. Pourtant, cette communauté bactérienne participe à un processus majeur pour les agro-écosystèmes : la nitrification.

Le processus de nitrification est composé de 2 étapes :

- la nitritation qui consiste en l'oxydation du  $\text{NH}_4^+$  en  $\text{NO}_2^-$ , est réalisée par les Ammonia Oxidizing Bacteria (AOB) and Ammonia Oxidizing Archaea (AOA) (Kowalchuk and Stephen, 2001; Leininger *et al.*, 2006) ;
- la nitratisation qui consiste en l'oxydation du  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{NO}_3^-$ , est réalisée par les Nitrite Oxidizing Bacteria (NOB) (Prosser, 1989).

Alors que de nombreuses études ont porté sur l'écologie des bactéries nitrifiantes dans de très nombreux écosystèmes (Kowalchuk and Stephen, 2001; Avrahami *et al.*, 2003; Patra *et al.*, 2005; Webster *et al.*, 2005, Leininger *et al.*, 2006; He *et al.*, 2007; Le Roux *et al.*, 2008), très peu ont concerné le groupe des NOB. Deux raisons sont à l'origine du faible nombre des études sur l'écologie des NOB. Tout d'abord, étant donné que le nitrite ne s'accumule généralement pas dans les sols, peu d'intérêt a été accordé à la nitratisation alors considérée comme une étape non limitante. Mais surtout, jusqu'à il y a peu de temps, aucun outil moléculaire n'était disponible pour étudier aisément ce groupe bactérien. L'apparition de méthodes développées au sein de notre laboratoire et permettant de cibler la sous-unité catalytique de la nitrite-oxydoréductase (l'enzyme clé de la nitratisation) a permis d'analyser la structure génétique (par PCR-DGGE, Poly *et al.*, 2008, Wertz *et al.*, 2008) et les effectifs de la communauté nitrifiante (par qPCR, Commeaux *et al.*, 2008). Dans ce travail de thèse, nous avons appliqué ces nouvelles méthodes à l'étude de la communauté des bactéries nitrifiantes du type *Nitrobacter* dans un contexte de changements de mode de labour des systèmes cultivés. En effet, de plus en plus couramment dans les agrosystèmes, des techniques prônant





**Figure 1:** Schéma des changements de mode de labour appliqués sur les sols cultivés du site de Boigneville (Collaboration, Arvalis Institut du Végétal)

la réduction du labour se développent dans le but de prévenir les risques d'érosion et d'améliorer la séquestration du carbone. Mais il est fréquent que les agrosystèmes soient soumis à des événements de labour (par exemple, en France et en 2007, seules 11% des cultures n'avaient pas subi de labour durant les 7 années précédentes (Chapelle-Barry, 2008).

### **Démarche expérimentale**

Cette étude a été faite sur un site de suivi long terme (14 ans) de pratiques culturales identiques du point de vue des rotations de culture, apports de fertilisants et de traitements phyto-sanitaires similaires, mais impliquant soit un travail du sol simplifié par utilisation du semis direct (sans labour) soit le labour. Un changement des pratiques de labour a été effectué sur la moitié des parcelles (i) en mettant en place le labour sur des systèmes initialement sans labour et (ii) en arrêtant le labour sur des systèmes initialement labourés. La moitié des autres parcelles a été maintenue avec le travail du sol initial pour disposer de contrôles « labourés » et « non labourés ».

Nous avons suivi durant 17 mois après les changements de pratiques de labour, les effectifs (par qPCR), l'activité nitrifiante (par tests biochimiques) et la diversité de cette communauté (par PCR-DGGE ciblant le gène fonctionnel *nirA*). Par ailleurs, nous avons également mesuré des variables environnementales majeures pour cette communauté : la disponibilité en azote via une mesure du flux brut de minéralisation par la technique de dilution isotopique  $^{15}\text{N}$ , la teneur en eau du sol et la teneur en carbone organique.

### **Objectifs :**

Le principal objectif de cette partie de ma thèse a été de comprendre la réponse des bactéries nitrifiantes du type *Nitrobacter* après l'application et l'arrêt du labour dans des systèmes cultivés.

Plus précisément, nous souhaitons identifier les facteurs déterminant les changements de l'activité nitrifiante suite à de tels changements de mode de gestion, à savoir :

- dans quelle mesure les changements de cette activité pouvaient résulter de changements d'effectif (évalués par qPCR) et/ou de diversité de la communauté NOB (évalués par PCR-DGGE et clonage-séquençage) ; et
- dans quelle mesure les changements de cette activité pouvaient résulter de changements de variables environnementales majeures pour cette communauté i.e. la disponibilité en azote, en carbone, et humidité.



Cet article a été soumis le 28 mai à la revue « Environmental Microbiology ».

### **Principaux résultats et conclusion**

L'activité nitrifiante a été, pour chaque date de prélèvement, significativement plus élevée dans les sols en semis direct comparés aux sols labourés. De plus, les activités étaient similaires dans les horizons 0-5cm et 5-20cm des sols labourés alors qu'elles étaient plus élevées dans l'horizon 0-5cm que dans l'horizon 5-20cm des sols en semis direct (stratification verticale de l'activité dans les sols non labourés). L'application du labour a engendré une rapide et forte baisse de l'activité nitrifiante alors que l'arrêt du labour n'a pas causé de changements et ce, même après 17 mois. La baisse de l'activité dans les sols nouvellement labourés serait donc la conséquence du labour engendrant un mélange de la couche de sol de surface caractérisée par de forts niveaux d'activité avec la couche plus profonde caractérisée par de plus faibles activités. A l'inverse, la stratification verticale de l'activité nitrifiante dans les sols où le labour a été arrêté semblerait nécessiter plusieurs années pour s'installer.

L'activité nitrifiante s'est révélée fortement corrélée aux effectifs mais faiblement à la structure de la communauté nitrifiante de type *Nitrobacter*. De plus, l'activité nitrifiante était fortement corrélée au flux brut de minéralisation utilisé comme approximation de la disponibilité en azote. Par ailleurs, nous avons observé que, dans les systèmes non-labourés, une population nitrifiante de type *Nitrobacter* était sélectionnée. Nos résultats suggèrent également que la plus forte disponibilité en azote dans les systèmes non labourés pourrait augmenter le rôle fonctionnel des bactéries nitrifiantes de type *Nitrobacter* par rapport à d'autres communautés nitrifiantes notamment les *Nitrospira*.

Afin de préciser l'identification des facteurs déterminants dans (i) la réponse de l'activité de nitrification face aux changements de pratiques de labour et (ii) la sélection de populations spécifiques dans les sols contrôles non labourés (NN), une expérience complémentaire a été réalisée et sera présentée à la fin de ce chapitre.



# **Response of *Nitrobacter*-like nitrite oxidizers to changes in tillage practices and link with nitrite oxidation activity**

E. ATTARD<sup>1</sup>, F. POLY<sup>1</sup>, F. LAURENT<sup>2</sup>, C. COMMEAUX<sup>1</sup>, S. RECOUS<sup>3,4</sup> & X. LE ROUX<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> *Laboratoire d'Ecologie Microbienne, Université de Lyon, Université Lyon 1, UMR CNRS 5557, USC INRA 1193, bât. G. Mendel, 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne, France*

<sup>2</sup> *ARVALIS Institut du Végétal, 91720 Boigneville, France*

<sup>3</sup> *INRA, UR1158 Unité d'Agronomie, , rue F. Christ, F-02000 Laon, France*

Submitted to: *Environmental Microbiology*

Running title: NOB response to tillage practices

\* Corresponding author:

*tel:* (33) 4 72 43 13 79

*fax:* (33) 4 72 43 12 23

*email:* [leroux@biomserv.univ-lyon1.fr](mailto:leroux@biomserv.univ-lyon1.fr)



## Summary

Information on the ecology of nitrite-oxidizing bacteria, NOB, in soil ecosystems, and their response to disturbances such as those generated by agricultural practices is scarce. During 17 months, we surveyed the nitrite-oxidizing enzyme activity, NOEA, and the abundance and community structure of the *Nitrobacter*-like NOB (by qPCR, PCR-DGGE and cloning-sequencing targeting the functional *nxrA* gene) after establishment of tillage on a previously no tillage system, after cessation of tillage on a previously tillage system, and on control tillage and no-tillage systems. Soil environmental variables (moisture, organic carbon content, and gross ammonification measured by the  $^{15}\text{N}$  dilution technique) were also surveyed. NOEA was always higher for the no-tillage than tillage treatments. Establishment of tillage led to a strong and rapid decrease in NOEA whereas cessation of tillage did not lead to marked changes in activity even after 17 months. NOEA was correlated strongly to the abundance and weakly to the community structure of *Nitrobacter-like* NOB, although selection of a dominant population was observed under no-tillage. NOEA was strongly related to gross ammonification. Our results also suggest that no-tillage systems could enhance the functional role of *Nitrobacter-like* NOB over NOB of other genera due to higher N availability as compared to tillage systems.





## Introduction

Nitrification, i.e. the oxidation of  $\text{NH}_4^+$  to  $\text{NO}_3^-$ , is a key process of the N-cycle in many terrestrial ecosystems. This process is of crucial importance since it largely regulates, directly or indirectly, the balance of inorganic nitrogen (N forms) in soil, the leaching of nitrate into groundwater and the emission of nitrogen oxides from soils. Nitrification is a 2-step process, consisting of (i) the oxidation of  $\text{NH}_4^+$  to  $\text{NO}_2^-$  by Ammonia Oxidizing Bacteria (AOB) and Ammonia Oxidizing Archaea (AOA) (Kowalchuk and Stephen, 2001; Leininger *et al.*, 2006), and (ii) the oxidation of  $\text{NO}_2^-$  to  $\text{NO}_3^-$  by Nitrite Oxidizing Bacteria (NOB) (Prosser, 1989). Whereas soil AOB are nearly restricted to a monophyletic group, NOB are distributed more widely, among  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$  classes of proteobacteria and *Nitrospira* phylum for *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina* and *Nitrospira*, respectively (Orso *et al.*, 1994; Teske *et al.*, 1994; Koops and Pommerening-Roser, 2001; Alawi *et al.*, 2007). Many studies have analyzed the ecology of nitrifiers in a broad range of soil environments, but most of them have focused on AOB (Kowalchuk and Stephen, 2001; Avrahami *et al.*, 2003; Patra *et al.*, 2005; Webster *et al.*, 2005), and recently AOA (Leininger *et al.*, 2006; He *et al.*, 2007; Le Roux *et al.*, 2008). Indeed, since  $\text{NO}_2^-$  generally does not accumulate in the environment, ammonia oxidation is often assumed to be the rate-limiting step of nitrification. Furthermore, molecular tools for investigating the diversity and abundance of AOB and AOA have been developed for more than a decade and for a few years, respectively (Kowalchuk *et al.*, 1997; Leininger *et al.*, 2006). In contrast, no equivalent tool was available to study the ecology of NOB until recently.

This explains that knowledge of the ecology of nitrite oxidizers in soil systems is very scarce. The response of NOB diversity to different environmental drivers in soil has been reported in a few studies by targeting 16S rRNA genes of *Nitrobacter* or *Nitrospira* (Navarro *et al.*, 1992; Freitag *et al.*, 2005; Siripong and Rittmann, 2007), but such an approach is difficult due to the polyphyletic distribution of NOB and the strong similarity of 16S sequences among these organisms (Orso *et al.*, 1994). Recently, Vanparys *et al.* (2007) designed primers targeting *16S* and *nxr* genes for phylogenetic analysis of *Nitrobacter* strains. Concurrently, primers targeting *Nitrobacter*-like *nxrA* gene encoding the catalytic subunit of the nitrite-oxidoreductase, the key enzyme for nitrite oxidation (Bartosch *et al.*, 2002), have been designed (Poly *et al.*, 2008) and used to develop a fingerprint tool (Wertz *et al.*, 2008) and a quantitative PCR tool. These recent advances have paved the way to comprehensive studies of the response of *Nitrobacter*-like NOB community to changes in environmental



conditions, and analysis of their possible role to explain changes in nitrite oxidation activity between soil systems.

The objective of our study was to understand the response of the soil *Nitrobacter*-like community to application and cessation of tillage in a cropping system. Indeed, changes in tillage practices affect an increasingly large percentage of cropped lands, in particular due to the spread of conservation tillage worldwide during the last two decades, and the fate of soil fertility after conversion to no-tillage is a crucial issue. We hypothesized that (i) because the suppression of tillage leads to the accumulation of organic matter in the very upper layer of soil (Balesdent *et al.*, 2000), NOB could experience both a higher organic C concentration and a higher N availability in no-tillage situations, leading to different characteristics of the NOB populations, and (ii) ploughing soils previously not tilled implies a soil mixing and homogenization over the tillage depth, that would affect quickly the characteristics of the NOB community.

Changes in NOB activity can be explained by changes in NOB abundance and/or changes in NOB specific activity (i.e. activity per cell). The latter can vary among species in a given environment and for a given species according to environmental conditions (Degrange *et al.*, 1997). Therefore, we aimed at determining to what extent changes in nitrite oxidation activity in soil induced by changes in tillage practices can result from changes in the abundance (evaluated by qPCR) and/or diversity (evaluated by PCR-DGGE and cloning-sequencing) of the *Nitrobacter*-like NOB community. We also aimed at identifying the main environmental drivers of these changes among the different possible ones for NOB according to their ecological requirements : N availability, moisture, and organic carbon availability.

## **Experimental procedure**

### **Study site, treatments and soil sampling**

The experimental site was located at Boigneville (northern France, 48°33'N, 2°33'E). The soil is a Haplic Luvisol with a deep loam overlying cracked calcareous material (Oorts *et al.*, 2007). We used 4 plots (10 x 48m) that had been under tillage for 14 years at the start of the experiment (T treatment : one tillage event every winter) and 4 plots under no tillage (N treatment). Whatever the tillage practice, all the plots underwent a spring barley-field pea-winter and wheat continuous rotation and received the same amounts of fertilizers and pesticides. On the experimental site, harvest of barley occurred in July 2005.



In mid-November 2005 during the fallow period following spring barley crop, half of the plots (i.e. 5 x 48m) were submitted to a shift in their tillage practices : tillage was applied to half of the surface of each previously no-till plot (NT treatment), and half of the surface of each previously tilled plot was submitted to no-tillage (TN treatment). Management was left unchanged for the remaining half of the plots that were used as controls for tillage (TT treatment) and no-tillage (NN treatment). Each of the 4 treatments had 4 replicates (i.e. 4 plots) randomly distributed in the experimental area. Pea was sown in February 2006 and was harvested in July 2006. The second tillage event occurred in October 2006 (11 months after experiment start) for the TT and NT treatments. Lastly, wheat crop was sown in February 2007.

Soils were first sampled just before the changes in tillage practices in November 2005. Soil was then sampled 0.5, 4, 11 and 17 months after the changes in tillage practices. For each sampling date, 10 soil cores were randomly sampled in the 0-5cm layer and 5 soil cores in the 5-20cm layer per plot. For each layer, the soil cores were pooled and sieved at 4mm. Soils were stored a few days at 4°C before assays for nitrite-oxidizing enzyme activity, gross ammonification and organic C content. A sub-sample of fresh soil was stored at -18°C for molecular analyses. At each sampling date, total C and ammonium and nitrate contents were determined for each treatment and soil depth.

### **Assays for nitrite-oxidizing enzyme activity**

Nitrite-oxidizing enzyme activity, NOEA, was determined using the method described by Wertz *et al.* (2007) modified from Smorzewski and Schmidt (1991). Briefly, samples of fresh soil (3 g equivalent dry mass) were incubated with 30 ml of a solution of NaNO<sub>2</sub> (5 µg of N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> g<sup>-1</sup> dry soil) at 28°C for 30h with shaking. During incubation, 1.5 ml of the suspensions was sampled at 0, 9, 24 and 30h and centrifuged (5000 r.p.m. for 2 min). The supernatants were then filtered (0.2 µm pore size) and analyzed for NO<sub>2</sub><sup>-</sup> concentration on a spectrophotometer (Uvikon 800, Leeds, UK) at 520 nm using Griess reagent. A linear rate of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> consumption was always observed during the 30h period.

### **Soil DNA extraction and measurement of *Nitrobacter*-like *nxrA* copy abundance by quantitative PCR**

DNA was extracted for each frozen soil sub-sample using the PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA).



Quantitative PCR assays were carried out with Lightcycler 480 (Roche Diagnostics, Meylan, France) using *nxA* primers F1norA (5'CAGACCGACGTGTGCGAAAG3') (Poly *et al.*, 2008) and R2norA (5'TCCACAAGGAACGGAAGGTC 3') (Wertz *et al.*, 2008). Those primers are known to amplify *Nitrobacter*- and *Nitrococcus*-like *nxA* fragments but not *Nitrospira*-like *nxA* (Wertz *et al.*, 2008) for which no primers targeting *nxA* were available. The 20 $\mu$ L final volume PCR mix contained (final concentrations) QuantiTect SybrGreen PCR Master Mix 1X (Qiagen, Courtaboeuf, France), 0.5 $\mu$ M of each primers, and 40 ng of soil DNA extract or 5 $\mu$ L of tenfold standard serial dilutions ranging from 10<sup>7</sup> to 10<sup>1</sup> *nxA* copies of genomic DNA from *Nitrobacter hamburgensis* X14 (DSMZ 10229). Thermal cycling was carried out by using an initial enzyme activation step at 95°C for 15 min followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 30s, annealing at 55°C for 45s and elongation at 72°C for 45s (Lightcycler 480, Meylan, France). Melting curves and amplified *nxA* fragment length, observed after agarose gel running of randomly chosen final PCR products, were used to check amplification specificity. Low inhibition of amplification (-3%) without any treatment effects was observed when 10<sup>5</sup> standard copies was mixed with 40 ng of soil DNA.

#### **Characterization of *Nitrobacter*-like NOB community structure by PCR-DGGE targeting *nxA***

*NxA* sequences were amplified according to Wertz *et al.* (2008) with the same primers as used for qPCR. Briefly, PCR was performed using 20 ng of DNA. The final reagent concentrations were 0.5  $\mu$ M of primers, 200 $\mu$ M of each dNTP, 0.25  $\mu$ g of T4 protein (Qbiogene, Carlsbad, USA), 0.88 U of Taq Phusion™ Hot Start (Ozyme, St Quentin-Yvelines, France), qsp 25  $\mu$ L with the HF buffer provided with the Taq. A second PCR was performed in the same conditions as described above with the same primers containing a GC clamp added at the 5' end of the forward primer in a 50  $\mu$ L of final volume and without T4 protein. This approach is needed because direct amplification with clamped primers does not lead to *nxA* amplification from most soils (Wertz *et al.*, 2008). Thermocycling conditions for PCR were: 30 sec at 98°C followed by 35 cycles of 98°C for 10 sec, annealing at 60°C for 30 sec, and elongation at 72°C for 30 sec with terminal elongation at 72°C for 7 min.

Using a protocol modified from Wertz *et al.* (2008), PCR products were loaded on 8% polyacrylamide gels containing a gradient of 35 to 55% denaturant, 100% denaturing solution being defined as 7M urea and 40% formamide. Gels were run for 16h at 75V in 1X TAE buffer at 60°C. Gels were stained with Sybrgreen (Roche, Meylan, France) and then photographed with a UV source system (Fischer Bioblock Scientific, Illkirch, France) using





the software BiocaptMW (Vilber-Lourmat, France). DGGE banding profiles from all soil samples (an example is presented in Appendix 3) were analyzed using Gel ComparII software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) to obtain a matrix consisting of the relative intensity and position of each DNA band.

### **Cloning and sequencing of *nxrA* fragments and phylogenetic analysis**

In order to check the specificity of *nxrA* amplification and, complementary to the DGGE approach, to evaluate the possible existence of treatment-specific groups of *nxrA* sequences, the major *nxrA* fragment sequences present in each treatment 0.5 month after the change in tillage practices were determined by cloning and sequencing. Clone libraries were generated from PCR products obtained by amplification with *nxrA* primers from each treatment, i.e one NN, one TT, one NT and one TN soil samples for one date (0.5 month). Cloning was carried out using the pGEM T-Easy vector system (Promega Ltd, Southampton, UK) and JM109 supercompetent *Escherichia coli* cells (Stratagene Inc., Maidstone, UK) ; 72 clones randomly selected from each treatment (total of 288 clones) were sequenced (Genome Express, Meylan, France).

In order to link possible treatment-specific *nxrA* sequences identified by the cloning-sequencing approach to DGGE profiles surveyed for all soil samples and all dates, the major bands (around 10) were excised from the DGGE profiles for a few soil samples encompassing NN, NT, TN and TT treatments. After elution of DNA in water (65°C during 30min), PCR targeting *nxrA* and cloning were performed as described above. We randomly used 3 to 5 clones obtained from each band to be reamplified and PCR products were loaded on DGGE gels to check their migration distance. 94 clones were then used for sequencing as described above.

*NxrA* sequences were aligned using Muscle alignment of SeaView software (Galtier *et al.*, 1996) with partial *nxrA* sequences of cultured NOB available in Genbank, with partial *nxrA* sequences of uncultured NOB available in Genbank and with partial sequences of *narG* genes of nitrate reducing strains, encoding the catalytic subunit of the nitrate-reductase. *NarG* sequences are indeed known to be close to *nxrA* sequences. Phylogenetic analysis was performed using 3 treeing methods: i) parsimony method, ii) neighbour joining method with HKY model of substitution, and iii) maximum likelihood tree, using 4 categories of substitutions with an estimated gamma distribution parameter and GTR model of substitution. The first two methods were performed with Phylowin software (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/phylowin.html>), while the third method was performed with Phyml software



(<http://atgc.lirmm.fr/phyml/>). Then a consensus tree was computed with Consense in the PHYLIP package 3.66 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). The consensus tree was visualized using NJ plot (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/njplot.html>). Bootstrap values (obtained from neighbour joining method with 1000 resampling) superior to 69 were reported on the consensus tree and used to identify clusters of sequences. These sequences have been submitted to the NCBI database under accession numbers (ongoing).

### **Determination of gross ammonification and gross ammonium immobilization by the $^{15}\text{N}$ dilution technique**

At one sampling date, 0.5 month after the changes in tillage practices, a sub-sample of fresh soil for each treatment and each soil depth (60g equivalent dry mass) was spread thinly and sprayed with a  $^{15}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  solution ( $15 \mu\text{g NH}_4^+\text{-N g soil}^{-1}$  enriched at 5 atom%  $^{15}\text{N}$ ) with an atomizer. Soil was then mixed, separated into two sub-samples placed in glass vessels and incubated at  $15^\circ\text{C}$ . After 2 hours, one vessel was removed from the incubator and soil was shaken ( $30 \text{ rotations min}^{-1}$ ) with 100mL of KCl 1M during 30min. After centrifugation ( $15\text{min}; 5,800 \times g$ ), supernatants were filtered. The second sub-sample was removed from the incubator after 26h and was submitted to the same extraction with KCl. A microdiffusion technique (Brooks *et al.*, 1989) was used to measure  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  contents and their  $^{15}\text{N}$  abundance in the extracts by mass spectrometry (N analyzer Euro EA, Eurovector, Milano, Italia and Delta Advantage, Thermo-Electron, Bremen, Deutschland). Gross ammonification and gross ammonium immobilization rates were calculated using dilution equations as described by Barraclough (1991).

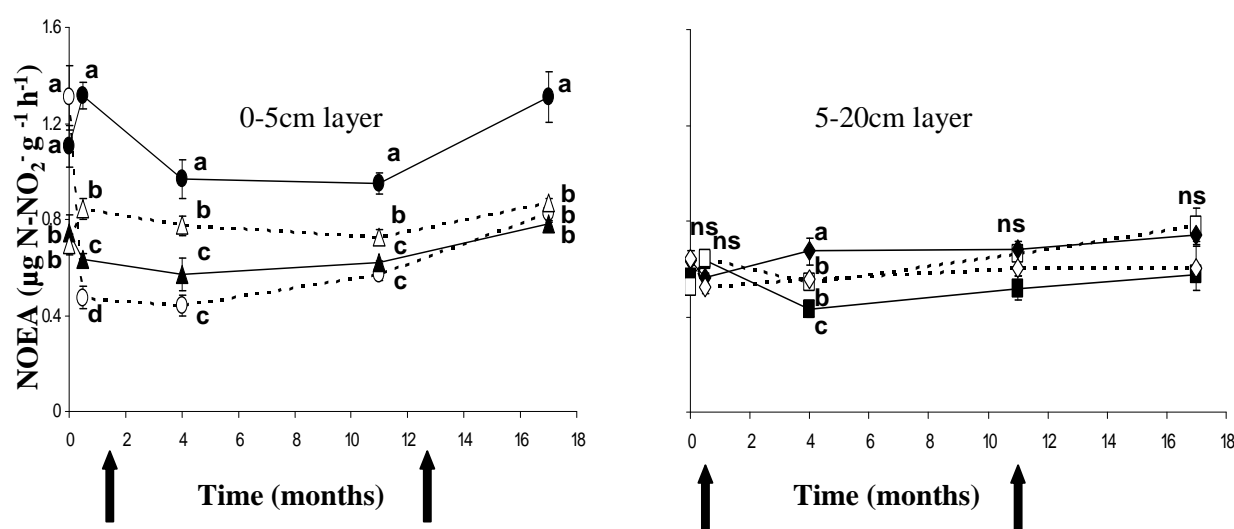
### **Measurements of soil environmental variables**

For each soil sample and each date, soil moisture (w/w) was measured on a sub-sample (around 7 g) of each fresh soil sample. The soil mineral nitrogen ( $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$ ) was extracted with 1M KCl (1:3 soil/solution ratio), centrifuged for 15min at  $5,800 \times g$  and filtered on a Durieux No.3 paper disc. The mineral N in the soil extracts was analyzed by continuous flow colorimetry (TRAACS 2000, Irama corp, Milwaukee, USA). The concentrations of  $\text{NO}_3^-$  were determined as described by Kamphake *et al.* (1967) and  $\text{NH}_4^+$  concentration as reported by Krom (1980). Total C of soil samples was measured using an elemental analyzer (NA 1500, Carlo Erba, Val de Reuil, France).

### **Data analyses and statistical tests**

**Table 1** : Results ( $p$  values) of the one-way ANOSIM for comparisons of the NOB community structure in the 0-5cm soil layer between each pair of treatments for each sampling date. NN: No-tillage control; TT: Tillage control; NT: Change from no-tillage to tillage; TN: Change from tillage to no-tillage. NS: not significant at the  $p$  level 0.05.

	Time after changes in tillage practices (months)				
	0	0.5	4	11	17
NN vs TT	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029
NT vs NN	NS	0.029	0.029	0.029	NS
NT vs TT	0.029	NS	NS	NS	NS
TN vs TT	NS	0.029	0.029	0.029	0.029
TN vs NN	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029



**Figure 1** : Temporal variations in nitrite-oxidizing enzyme activity (NOEA) after changes in tillage practices in (left) the 0-5cm soil layer, and (right) the 5-20cm soil layer. For the upper soil layer, ●: no tillage controls, NN treatment; ○: change from no-tillage to tillage, NT treatment; ▲: tillage control, TT treatment; △: change from tillage to no-tillage, TN treatment. For the lower soil layer, ■: no tillage control, NN treatment; □: change from no-tillage to tillage, NT treatment; ◆: tillage control, TT treatment; ◇: change from tillage to no-tillage, TN treatment. Arrows indicate the dates of tillage events (i.e. for TT and NT). Bars are standard errors associated to treatment means ( $n=4$ ). For each date and each soil layer, values with different letters differ significantly with  $p < 0.05$ . ns: no significant treatment effect.

Fisher's test was used to determine if NOEA means differed significantly between treatments at each date. A similar test was used to evaluate treatment effect on the relative intensity of a key DGGE band. Pearson's test was used to determine if the correlation between NOEA and the abundance of *Nitrobacter*-like NOB abundance or each soil variable was significant.

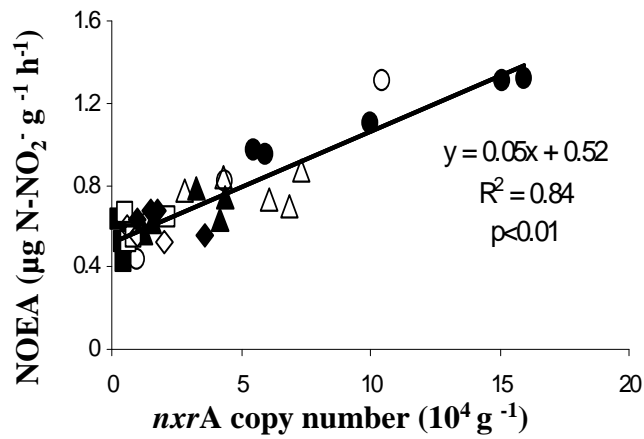
To analyze matrices obtained from DGGE banding profiles, the total band intensity for each lane was normalized among lanes and data were square root-transformed. Community matrices were analyzed using the PRIMER software (PRIMER-E Ltd, Plymouth, UK). Rank similarity matrices were computed and used to construct 'maps' highlighting the similarity of community genetic structures among soil samples by non-metric multidimensional scaling (MDS) (Kruskal and Wish, 1978). One-way ANOSIM (ANalysis of SIMilarity) was performed to test, for each sampling date, the significance of treatment effect on the community structure.

For each date, the correlation between NOEA and the overall genetic structure of the *Nitrobacter*-like NOB community was tested by a two-step approach, graphically and then statistically. First, this correlation was visualized by representing activity values as discs whose size is proportional to activity level and superimposing these symbols on the MDS ordination of community structure for the corresponding soil samples. Secondly, Spearman correlation coefficient and associated p significance level (obtained by a permutation test using 5000 permutations) were computed to quantify the correlation between the rank similarity matrices obtained for activity on the one hand and for genetic structure on the other hand (Clarke and Ainsworth, 1993).

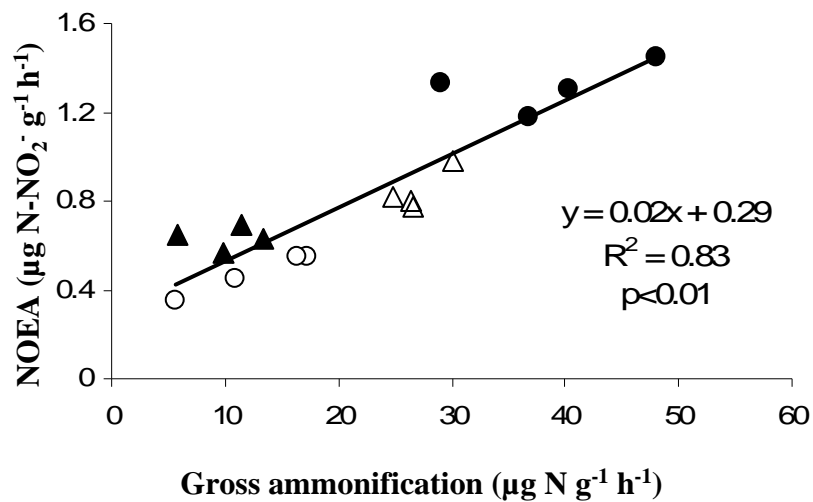
## **Results**

### **Nitrite-oxidizing enzyme activity**

In the 0-5cm soil layer, nitrite-oxidizing enzyme activity, NOEA was 1.6- to 2-fold higher for the control no-tillage NN than the control tillage TT treatments at all sampling dates (Fig. 1 left). Two weeks after the change in tillage practices, NOEA for NT (previously no tillage soils submitted to tillage) as for TT treatments was lower than for NN treatment. Four months after application of tillage and onwards, NOEA value for NT treatment was similar to that observed for TT treatments. Conversely, after cessation of tillage, NOEA values for TN treatment (previously tilled soils submitted to no tillage) remained intermediate



**Figure 2 :** Correlation between nitrite-oxidizing enzyme activity (NOEA) and the abundance of *Nitrobacter*-like *nxrA* copies. The correlation includes all treatments, both soil layers and all dates. Each point corresponds to a treatment mean at a given date and for a given soil layer (n=4). For symbol legends, see Fig. 1.



**Figure 3 :** Correlation between nitrite-oxidizing enzyme activity (NOEA) and gross ammonification rate measured for soils sampled from the 0-5cm layer 0.5 month after the change in tillage practices. Each point corresponds to values obtained for one individual plot. For symbol legends, see Fig.1.

between those observed for control TT and NN treatments, although the difference in NOEA between TT or NT soils and TN soils decreased with time.

In the 5-20cm soil layer, NOEA values did not significantly differ between treatments except at one date (Fig. 1 right) and were close to values observed in the 0-5cm layer for the TT control treatment.

### **Relationship between NOEA and *Nitrobacter*-like *nxrA* copy number**

NOEA was significantly and strongly correlated with *Nitrobacter*-like *nxrA* copy number, and this relationship held for all treatments, soil layers and sampling dates (Fig. 2). In particular, both NOEA levels and copy numbers were high for the no-tillage control treatment in the 0-5cm soil layer (Fig. 2). The intercept of the regression showed that in soils with very low *Nitrobacter*-like *nxrA* copy number, NOEA value was around 40% of that observed for soils with highest values of NOEA and copy number. As a whole, changes in *Nitrobacter*-like *nxrA* copy number explained 84% of the observed variance in NOEA.

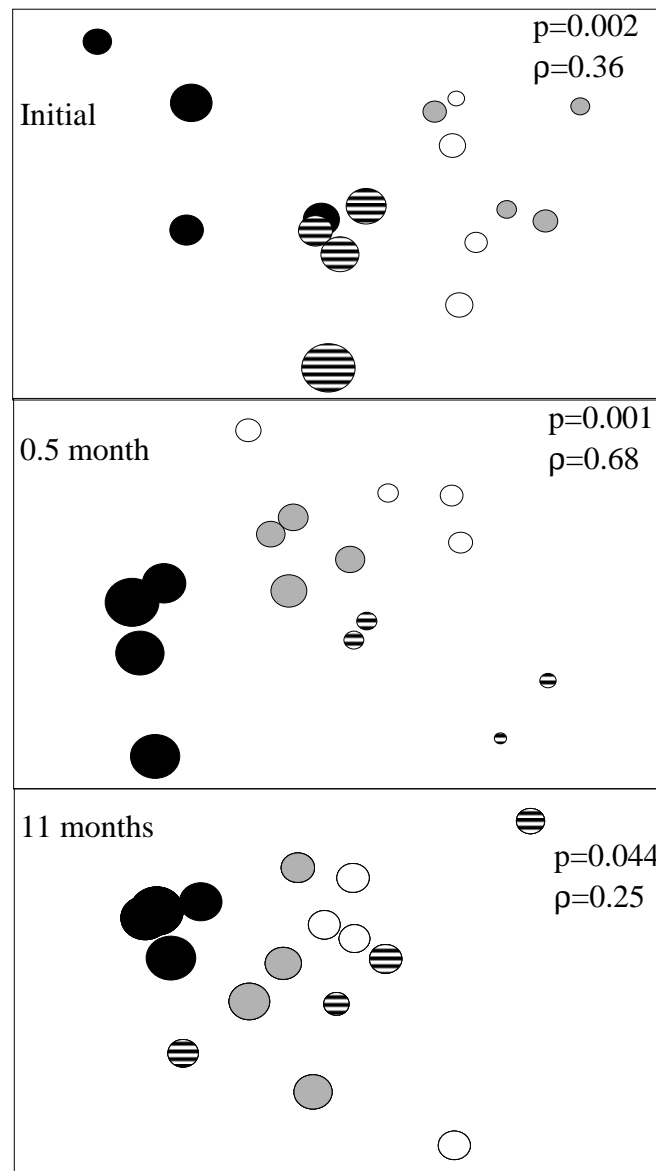
### **Correlation between NOEA and gross ammonification rate, soil moisture and organic carbon content**

Two weeks after the change in tillage practices, variations in NOEA in the 0-5cm layer were well predicted by variations in gross ammonification rate (also named gross mineralization rate). Indeed, NOEA was strongly and linearly related to gross ammonification ( $p < 0.01$ ;  $R^2 = 0.83$ ) (Fig. 3). The relationship still holds when gross ammonification minus gross ammonium immobilization was used as the explanatory variable ( $p < 0.01$ ;  $R^2 = 0.62$ ) (not shown). For comparison, the relationship between NOEA and soil organic carbon content and moisture led respectively to  $R^2 = 0.64$  ( $p < 0.01$ ) and  $R^2 = 0.34$  ( $p = 0.02$ ) (not shown).

### ***Nitrobacter*-like NOB community structure and correlation with NOEA**

The genetic structure of the *Nitrobacter*-like NOB community always differed between NN and TT control treatments, in both the 0-5cm (Table 1 and Fig. 4) and 5-20cm (Appendix 1) soil layers. In the 0-5cm soil layer, community structures differed between NT and NN treatments immediately after the tillage of November 2005 (0.5 months); similarly, community structures differed between TN and TT treatments immediately after this tillage event (Table 1 and Fig. 4). After four months, the community structure for NT treatment became non significantly different to that in TT treatment. In contrast, after cessation of





**Figure 4** : Correlation between nitrite-oxidizing enzyme activity (NOEA) and the genetic structure of the *Nitrobacter*-like NOB community for soils of the 0-5cm layer : (top) just before the change in tillage practices, and (middle) 0.5 month and (bottom) 11 months after the changes in tillage practices. The correlation is visualized by superimposing discs proportional to activity level on the MDS ordination of the soil samples according to community structure. The significance level of the correlation (p value) obtained between activity and community structure and the strength of this correlation (Spearman coefficient,  $\rho$ ) are presented. Results obtained at 4 and 17 months are close to that obtained at 11 months and are not displayed (p=0.20 with  $\rho$ =0.09 and p=0.41 with  $\rho$ =0.03 respectively).

● : no tillage controls, NN treatment; ⊖ : change from no-tillage to tillage, NT treatment;  
○ : tillage controls, TT treatment; ● : change from tillage to no-tillage, TN treatment.

tillage, the community structure for TN treatment remained significantly different from that of NN treatment, even after 17 months (Table 1).

Before and after the changes in tillage practices, a significant correlation was observed between NOEA levels and the *Nitrobacter*-like NOB community structure in the 0-5cm soil layer (Fig. 4), showing that the closer the NOEA values, the more similar the community structure. However, the correlation was particularly weak at 11 months with a  $\rho$  value of 0.25. When considering both soil layers and all sampling dates, the correlation between NOEA and community structure was significant but weak ( $p=0.001$   $\rho=0.14$ ).

### **Phylogeny of partial *nxrA* sequences retrieved from soils**

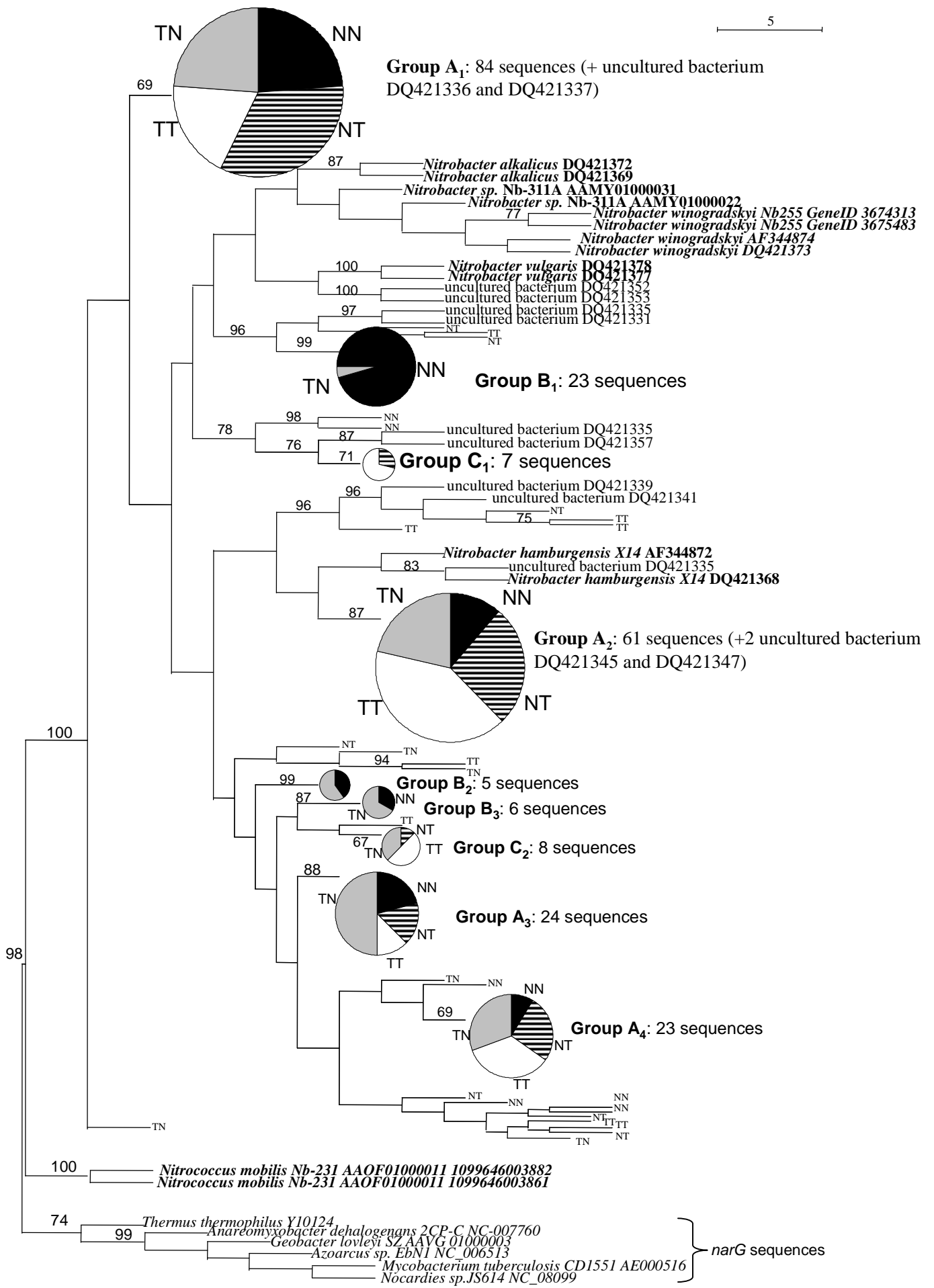
All the *nxrA* sequences retrieved from soils under different tillage practices clustered with *nxrA* sequences of *Nitrobacter* cultivated strains, apart from *narG* sequences outgroup (Fig. 5). Moreover, a large part of these *nxrA* sequences (59%) clustered with some *nxrA* sequences of uncultured bacteria which were retrieved from soils by Poly *et al.* (2008) and Wertz *et al.* (2008). The majority (i.e. 99 %) of partial *nxrA* sequences obtained from soils in our study did not finely cluster with the sequences of cultured nitrite-oxidizers (Fig. 5). The majority of *nxrA* sequences retrieved were distributed among 9 groups : in addition to the four groups A (71% of the sequences) where all treatments were represented, treatment-specific clusters (groups B and C) of partial *nxrA* sequences were observed (Fig. 5). The groups C<sub>1</sub> and C<sub>2</sub> were composed with 15 sequences retrieved only from soils with a past or present tillage history (NT, TT, TN). The groups B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub> only encompassed sequences retrieved from soils not submitted to a recent tillage event (NN and TN treatments). In particular, the group B<sub>1</sub> included only sequences retrieved from NN soils and marginally from TN soil, which corresponded to 33% of the sequences obtained from the NN treatment.

The sequencing of major DGGE bands allowed us to identify the DGGE band corresponding to the *nxrA* sequences of group B<sub>1</sub>. The increase in the relative intensity of this band in NN treatment as compared to the 3 other treatments was significant or marginally significant at 3 sampling dates (Appendix 2).

## **Discussion**

### **NOEA in tilled and no-tilled systems, and response to changes in tillage practices**

On the long term, here after 14 years, the main effect of the application of either continuous yearly tillage (TT) or continuous no tillage (NN) was to generate a different



**Fig. 5**

vertical distribution of nitrite-oxidizing enzyme activity (NOEA) in soil. Indeed, for the tilled system, NOEA was similar in the 0-5cm and 5-20cm soil layers, as a result of frequent mixing of the 0-20cm soil layer. Conversely, continuous no-tillage has led to a marked increase in NOEA in the 0-5cm soil layer, with an activity approximately two-fold higher than in the 5-20cm layer. The observed treatment effects on NOEA could be attributed unambiguously to tillage practices *sensu stricto* since the plots were subjected to similar other agricultural practices (particularly amount and frequency of pesticide and fertilizer supplies).

Although conversion to no-till soil management is widely spread worldwide in order to maintain soil quality, to increase organic matter content, to avoid erosion, and to attempt enhancing soil carbon sequestration, no-till systems are also frequently converted back to till systems for socio-economical reasons or due to weed control problems. However, to our knowledge, no previous study has detailed finely the temporal response of a key soil bacterial community following application and cessation of tillage. After application of tillage on a previously no-tillage system, a strong decrease of NOEA was immediately observed in the 0-5cm layer, which was likely due to the mixing of the 0-5cm and 5-20cm soil layers, the latter being characterized by low NOEA activity. Conversely, after cessation of tillage on a previously tillage system (TN treatment), a significant but very weak effect was observed on NOEA. This shows that, whereas application of tillage immediately suppresses the vertical distribution of NOEA in soil, the build up of this vertical distribution after cessation of tillage requires several years.

### **Environmental determinants of the NOEA response to tillage practices**

The possible environmental determinants of the observed variations in NOEA levels were mainly (i) soil moisture that can affect oxygen availability or induce drought conditions, (ii) N availability since nitrite is a key substrate for nitrite oxidizers, and (iii) organic carbon availability since some of the cultivated strains of the *Nitrobacter* genus can grow as autotrophs but also as mixotrophs and heterotrophs (Bock, 1976; Steinmuller and Bock, 1976; Degrange *et al.*, 1997). In our study, we observed that variations in NOEA were significantly but weakly correlated with soil moisture. Concurrently, changes in NOEA were significantly and strongly correlated to gross ammonification, and to a lesser extent to soil organic carbon. Our results thus suggest that mineral N supply was the major driver of changes in NOEA in these soil systems. Since, nitrite concentrations were always below detection limit in the studied soils, a direct measure of changes in the nitrite levels in soil was not possible. However, we can assume that ammonium supply will translate into nitrite supply for nitrite

**Figure 5:** Phylogenetic consensus tree of *nxrA* sequences (282 bp) retrieved from soils of the 0-5cm layer for the 4 tillage practices in relation to *nxrA* sequences of cultivable NOB (in bold italic), *nxrA* sequences of uncultured bacteria and *narG* sequences of nitrate reducers (in italic). Discs represent *nxrA* sequences in groups including more than 2 sequences and with bootstraps superior to 69. ●: no tillage controls, NN treatment; ⊖: change from no-tillage to tillage, NT treatment; ○: tillage controls, TT treatment; ●: change from tillage to no-tillage, TN treatment.

oxidizers because NOB are reported to be spatially linked to ammonia oxidizers (Maixner *et al.*, 2006) and to efficiently use nitrite produced from ammonium by ammonia oxidizers. Thus, we used gross ammonification as a proxy of N supply to nitrite oxidizers in the present study. Indeed, N fluxes, as determined here by  $^{15}\text{N}$  dilution method, are also a better estimate of N availability to micro-organisms than measurement of soil mineral N contents in field conditions, due to the possible high amplitude of changes in mineral N concentrations in soil with time, and to possible weak relationship between N pools and fluxes in soil. Furthermore, snapshot measurements of mineral N concentrations in soil are known to be sometimes questionable when used as proxies of N availability (e.g. Robson *et al.*, 2007). We also checked that changes in gross ammonium immobilisation did not strongly alter the relationship between NOEA and ammonium supply. For these reasons, gross ammonification is likely a useful proxy of nitrite supply to nitrite oxidizers in soil, and explained 84% of the overall temporal and spatial variations in NOEA in our study.

In response to tillage practices, the key role of mineral N supply for *Nitrobacter*-like activity in agricultural soils is consistent with the strong correlation between the activity of 2 *Nitrobacter* strains and  $\text{NO}_2^-$  concentrations observed in batch cultures (Feray and Montuelle, 2002). Similarly, in microcosms of sterile soils inoculated with *Nitrobacter* strains, Degrange *et al.* (1997) have reported a strong increase in nitrite oxidation activity after  $\text{NO}_2^-$  supply, whereas the supply of organic carbon had a weaker effect on NOB activity.

### **Relationship between NOEA and the abundance and diversity of *Nitrobacter*-like nitrite oxidizers**

The observed changes in NOEA induced by changes in tillage practices were strongly correlated with the changes in the abundance of *Nitrobacter*-like nitrite oxidizers, and a single relationship hold for all treatments, all sampling dates and both 0-5cm and 5-20cm soil layers. Such a strong coupling between the activity and abundance of the NOB community is not consistent with results reported in two previous studies that have focused on the effect of tillage on ammonia oxidizing bacteria. Indeed, when comparing till and no-till systems, Phillips *et al.* (2000) observed different nitrification levels without significant changes in the abundance of AOB, whereas Bruns *et al.* (1999) observed similar net nitrification rates despite different abundances of AOB. The decoupling between activity and abundance observed by these authors could be due to the implication of ammonia oxidizing archaea that were not analyzed because their role in ammonia oxidation has been identified only recently. In contrast, a strong coupling between nitrification and both AOB and AOA abundances have



been reported for grassland soils following changes in grazing regime (Le Roux *et al.*, 2008). More generally, nitrite oxidation activity has been reported to be related to *Nitrobacter* abundance in sterile soil microcosms inoculated with *Nitrobacter* strains (Degrange *et al.*, 1997), batch cultures of *Nitrobacter* strains (Feray and Montuelle, 2002) and river water (Cebren *et al.*, 2003). A striking result of the present study is that we observed a strong coupling between changes in NOEA and changes in the abundance of *Nitrobacter*-like nitrite oxidizers, given that the primers used for quantitative PCR did not target other possible genera of soil nitrite oxidizers, especially *Nitrospira* (Wertz *et al.*, 2008) that are likely also involved in nitrite oxidation in soil (Bartosch *et al.*, 2002). Our results can be explained if NOEA was mainly performed by *Nitrobacter*-like nitrite oxidizers in the studied soil systems, or if the abundance of *Nitrospira*-like nitrite oxidizers followed the same trend as that of *Nitrobacter*-like nitrite oxidizers. Actually, the observed correlation between NOEA and abundance of *Nitrobacter*-like nitrite oxidizers suggests a third hypothesis : the abundance of *Nitrobacter*-like nitrite oxidizers was indeed very low in soils with NOEA level around  $0.5 \mu\text{g N g}^{-1} \text{h}^{-1}$  (40% of maximum NOEA values observed in our study) so that nitrite oxidizers belonging to other genera such as *Nitrospira* were likely the key players in soils with low activity. Our results thus suggest an increase of the relative role of *Nitrobacter*-like nitrite oxidizers in soils with higher activity level that correspond to environments with higher N availability. This is consistent with the fact that *Nitrobacter*-like nitrite oxidizers are commonly assumed to be fast-growing r-strategists (for NOB) with low affinities for nitrite, whereas *Nitrospira*-like nitrite oxidizers would be K-strategists with higher affinities for nitrite (Schramm *et al.*, 1999; Wagner *et al.*, 2002; Kim and Kim, 2006; Blackburne *et al.*, 2007) although Maixner *et al.* (2006) reported significant functional diversity as regards to nitrite availability among lineages of *Nitrospira*.

In parallel, our DGGE results show that the genetic structure of the *Nitrobacter*-like community was significantly influenced by treatments effects. More particularly, our cloning-sequencing results suggested that some *nxrA* sequences (Group B<sub>1</sub>) were specific of no-till systems. Although cloning-sequencing was performed for only one soil per treatment, we were able to identify the DGGE band corresponding to this key NOB population and to check that sequences of group B<sub>1</sub> in NN soils dominated the *Nitrobacter*-like NOB community consistently over time (Appendix 2). This suggests that sequences corresponding to group B<sub>1</sub> were selected under high N and maybe also high organic carbon availability. Furthermore, the observed changes in NOEA were significantly correlated with the overall changes in the genetic structure of the *Nitrobacter*-like NOB community but to a lesser extent than with the





changes in abundance. Such a weak correlation between changes in the nitrite oxidizing activity and genetic structure of the *Nitrobacter*-like NOB community is consistent with results reported by Wertz *et al.* (2007) who showed that a heat shock induced a strong effect on the NOB abundance and NOEA with yet a moderate effect on the structure of the *Nitrobacter*-like NOB community. This weak coupling between nitrite oxidation activity and the genetic structure of *Nitrobacter*-like NOB community could be due to a high level of functional redundancy within this community as suggested by Wertz *et al.* (2007). Another possible explanation is that most of the populations detected were not active and did not have a major role in the NOB community activity, which could be tested by RNA-based approaches targeting active populations. A third explanation is that other major players such as *Nitrospira*-like nitrite oxidizers were not accounted for in these studies, and that, as observed in fresh water environments (Cebren and Garnier, 2005), shifts between *Nitrospira*-like nitrite oxidizers and *Nitrobacter*-like nitrite oxidizers would be more important than shifts of populations among *Nitrobacter*-like nitrite oxidizers to understand activity changes. In this context, ongoing studies characterizing the *nxrA* sequences of *Nitrospira*-like NOB (Daims H., personal communication) will greatly enhance our ability to draw a comprehensive view of NOB ecology in natural and managed environments.

#### **Acknowledgments:**

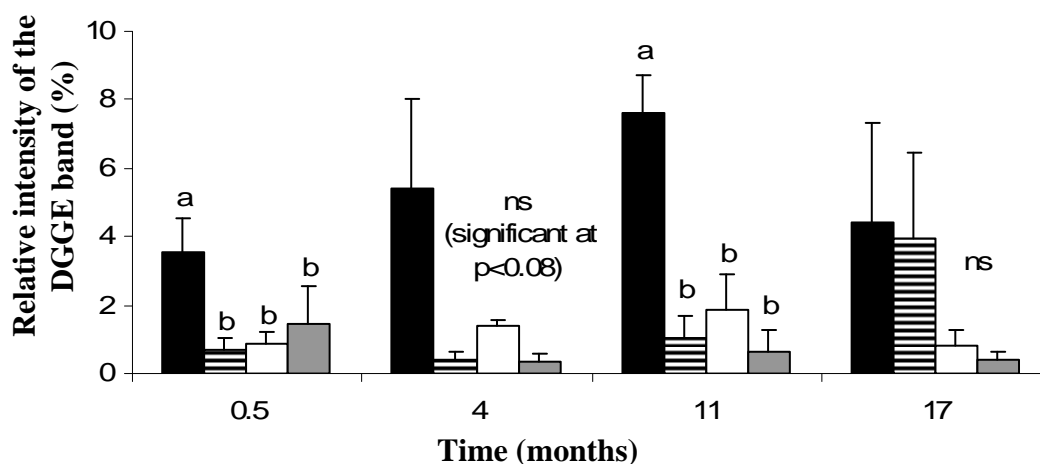
The project was funded by the GESSOL2 programme of the French Ministry of Environment and Sustainable Development (MEDD), and by the ECCO-PNBC programme. PhD funding for E. Attard was supplied by INRA and by the Région Poitou-Charentes.



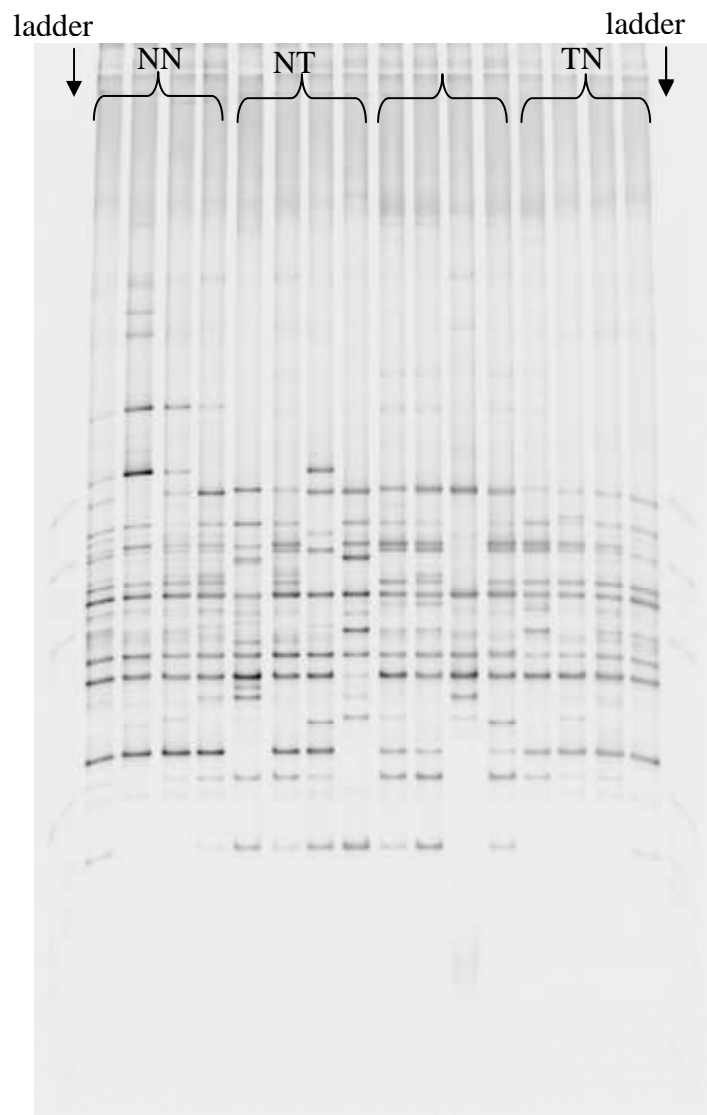
**Appendix 1** : Results ( $p$  values) of the one-way ANOSIM for comparisons of the NOB community structure in the 5-20cm soil layer between each pair of treatments for each sampling date. NN: No-tillage control; TT: Tillage control; NT: Change from no-tillage to tillage; TN: Change from tillage to no-tillage. NS: not significant at the  $p$  level 0.06.

	Time after changes in tillage practices (months)				
	0	0.5	4	11	17
NN vs TT	0.029	0.029	0.029	0.029	0.057
NT vs NN	NS	0.029	0.029	NS	NS
NT vs TT	0.029	0.057	0.057	0.029	NS
TN vs TT	NS	0.029	NS	0.057	NS
TN vs NN	0.057	0.029	0.029	NS	0.057

**Appendix 2** : Temporal variations in the relative intensity of the DGGE band that corresponds to the *nxA* sequences included in the group B<sub>1</sub> in the phylogenetic tree: □ no tillage controls, NN treatment; ▨ change from no-tillage to tillage, NT treatment; ■ : tillage controls, TT treatment; ▩ : change from tillage to no-tillage, TN treatment. For each date, values with different letters differ significantly with  $p < 0.05$ .



**Appendix 3 :** Example of a DGGE gel obtained to characterize the genetic structure of the *Nitrobacter*-like NOB community obtained for soils sampled 11 months after the changes in tillage practices. NN: No-tillage control; TT: Tillage control; NT: Change from no-tillage to tillage; TN: Change from tillage to no-tillage.



## References

- Alawi, M., Lipski, A., Sanders, T., Eva Maria, P., and Spieck, E. (2007) Cultivation of a novel cold-adapted nitrite oxidizing betaproteobacterium from the Siberian Arctic. *ISME J.* **1**: 256-264.
- Avrahami, S., Liesack, W., and Conrad, R. (2003) Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers. *Environ Microbiol* **5**: 691-705.
- Balesdent, J., Chenu, C., and Balabane, M. (2000) Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage. *Soil Till Res* **53**: 215-230.
- Barraclough, D. (1991) The Use of Mean Pool Abundances to Interpret N-15 Tracer Experiments .1. Theory. *Plant and Soil* **131**: 89-96.
- Bartosch, S., Hartwig, C., Spieck, E., and Bock, E. (2002) Immunological detection of nitrospira-like bacteria in various soils. *Microb Ecol* **43**: 26-33.
- Blackburne, R., Vadivelu, V.M., Yuan, Z.G., and Keller, J. (2007) Kinetic characterisation of an enriched Nitrospira culture with comparison to Nitrobacter. *Wat Res* **41**: 3033-3042.
- Bock, E. (1976) Growth of Nitrobacter in Presence of Organic-Matter .2. Chemo-Organotrophic Growth of Nitrobacter-Agilis. *Arch Microbiol* **108**: 305-312.
- Brooks, P.D., Stark, J.M., McInteer, B.B., and Preston, T. (1989) Diffusion Method to Prepare Soil Extracts for Automated N-15 Analysis. *Soil Sci Soc Am J* **53**: 1707-1711.
- Bruns, M.A., Stephen, J.R., Kowalchuk, G.A., Prosser, J.I., and Paul, E.A. (1999) Comparative Diversity of Ammonia Oxidizer 16S rRNA Gene Sequences in Native, Tilled, and Successional Soils. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2994-3000.
- Cebron, A., and Garnier, J. (2005) Nitrobacter and Nitrospira genera as representatives of nitrite-oxidizing bacteria: Detection, quantification and growth along the lower Seine River (France). *Wat Res* **39**: 4979-4992.
- Cebron, A., Berthe, T., and Garnier, J. (2003) Nitrification and nitrifying bacteria in the lower Seine River and estuary (France). *Appl Environ Microbiol* **69**: 7091-7100.
- Clarke, K.R., and Ainsworth, M. (1993) A Method of Linking Multivariate Community Structure to Environmental Variables. *Mar Ecol Prog Ser* **92**: 205-219.
- Degrange, V., Lensi, R., and Bardin, R. (1997) Activity, size and structure of a Nitrobacter community as affected by organic carbon and nitrite in sterile soil. *FEMS Microbiol Ecol* **24**: 173-180.

- Feray, C., and Montuelle, B. (2002) Competition between two nitrite-oxidizing bacterial populations: a model for studying the impact of wastewater treatment plant discharge on nitrification in sediment. *FEMS Microbiol Ecol* **42**: 15-23.
- Freitag, T.E., Chang, L., Clegg, C.D., and Prosser, J.I. (2005) Influence of inorganic nitrogen management regime on the diversity of nitrite-oxidizing bacteria in agricultural grassland soils. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8323-8334.
- Galtier, N., Gouy, M., and Gautier, C. (1996) SEAVIEW and PHYLO\_WIN: Two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comp Appl Biosci* **12**: 543-548.
- He, J., Shen, J., Zhang, L., Zhu, Y., Zheng, Y., Xu, M., and Di, H.J. (2007) Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environ Microbiol* **9**: 2364-2374.
- Kamphake, L. J., Hannah, S. A. and Cohen, J. M. (1967) Automated Analysis for Nitrate by Hydrazine Reduction. *Wat Res* **1**: 205.
- Kim, D.J., and Kim, S.H. (2006) Effect of nitrite concentration on the distribution and competition of nitrite-oxidizing bacteria in nitrification reactor systems and their kinetic characteristics. *Wat Res* **40**: 887-894.
- Koops, H.P., and Pommerening-Roser, A. (2001) Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiol Ecol* **37**: 1-9.
- Kowalchuk, G.A., and Stephen, J.R. (2001) Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annu Rev Microbiol* **55**: 485-529.
- Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R., DeBoer, W., Prosser, J.I., Embley, T.M., and Woldendorp, J.W. (1997) Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl Environ Microbiol* **63**: 1489-1497.
- Krom, M.D. (1980) Spectrophotometric Determination of Ammonia - a Study of a Modified Berthelot Reaction Using Salicylate and Dichloroisocyanurate. *Analyst* **105**: 305-316.
- Kruskal, J.B., and Wish, M. (1978) Multidimensional scaling. Beverley Hills, California.
- Le Roux, X., Poly, F., Currey, P., Commeaux, C., Hai, B., Nicol, G.W. *et al.* (2008) Effects of aboveground grazing on coupling among nitrifier activity, abundance and community structure. *ISME J.* **2**: 221-231.
- Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W. *et al.* (2006) Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* **442**: 806-809.

- Maixner, F., Noguera, D.R., Anneser, B., Stoecker, K., Wegl, G., Wagner, M., and Daims, H. (2006) Nitrite concentration influences the population structure of Nitrospira-like bacteria. *Environ Microbiol* **8**: 1487-1495.
- Navarro, E., Simonet, P., Normand, P., and Bardin, R. (1992) Characterization of Natural Populations of Nitrobacter Spp Using Pcr/Rflp Analysis of the Ribosomal Intergenic Spacer. *Arch Microbiol* **157**: 107-115.
- Oorts, K., Laurent, F., Mary, B., Thiebeau, P., Labreuche, J., and Nicolardot, B. (2007) Experimental and simulated soil mineral N dynamics for long-term tillage systems in northern France. *Soil Till Res* **94**: 441-456.
- Orso, S., Gouy, M., Navarro, E., and Normand, P. (1994) Molecular Phylogenetic Analysis of Nitrobacter Spp. *Int J Syst Bact* **44**: 83-86.
- Patra, A.K., Abbadie, L., Clays-Josserand, A., Degrange, V., Grayston, S.J., Loiseau, P. *et al.* (2005) Effects of grazing on microbial functional groups involved in soil N dynamics. *Ecol Monog* **75**: 65-80.
- Phillips, C.J., Harris, D., Dollhopf, S.L., Gross, K.L., Prosser, J.I., and Paul, E.A. (2000) Effects of Agronomic Treatments on Structure and Function of Ammonia-Oxidizing Communities. *Appl Environ Microbiol* **66**: 5410-5418.
- Poly, F., Wertz, S., Brothier, E., and Degrange, V. (2008) First exploration of Nitrobacter diversity in soils by a PCR cloning-sequencing approach targeting functional gene nxrA. *FEMS Microbiol Ecol* **63**: 132-140.
- Prosser, J.I. (1989) Autotrophic Nitrification in Bacteria. *Adv Microb Physiol* **30**: 125-181.
- Robson, T.M., Lavorel, S., Clement, J.C., and Le Roux, X. (2007) Neglect of mowing and manuring leads to slower nitrogen cycling in subalpine grasslands. *Soil Biol Biochem* **39**: 930-941.
- Schramm, A., de Beer, D., van den Heuvel, J.C., Ottengraf, S., and Amann, R. (1999) Microscale distribution of populations and activities of Nitrosospira and Nitrospira spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: Quantification by in situ hybridization and the use of microsensors. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3690-3696.
- Siripong, S., and Rittmann, B.E. (2007) Diversity study of nitrifying bacteria in full-scale municipal wastewater treatment plants. *Wat Res* **41**: 1110-1120.
- Smorzewski, W.T., and Schmidt, E.L. (1991) Numbers, Activities, and Diversity of Autotrophic Ammonia-Oxidizing Bacteria in a Fresh-Water, Eutrophic Lake Sediment. *Can J Microbiol* **37**: 828-833.



- Steinmuller, W., and Bock, E. (1976) Growth of Nitrobacter in Presence of Organic-Matter .1. Mixotrophic Growth. *Arch Microbiol* **108**: 299-304.
- Teske, A., Alm, E., Regan, J.M., Toze, S., Rittmann, B.E., and Stahl, D.A. (1994) Evolutionary Relationships among Ammonia-Oxidizing and Nitrite-Oxidizing Bacteria. *J Bact* **176**: 6623-6630.
- Vanparrys, B., Spieck, E., Heylen, K., Wittebolle, L., Geets, J., Boon, N., and De Vos, P. (2007) The phylogeny of the genus Nitrobacter based on comparative rep-PCR, 16S rRNA and nitrite oxidoreductase gene sequence analysis. *Syst Appl Microbiol* **30**: 297-308.
- Wagner, M., Loy, A., Nogueira, R., Purkhold, U., Lee, N., and Daims, H. (2002) Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Ant van Leeuw* **81**: 665-680.
- Webster, G., Embley, T.M., Freitag, T.E., Smith, Z., and Prosser, J.I. (2005) Links between ammonia oxidizer species composition, functional diversity and nitrification kinetics in grassland soils. *Environ Microbiol* **7**: 676-684.
- Wertz, S., Poly, F., and Le Roux, X. (2008) Development and application of a PCR-denaturing gradient gel electrophoresis tool to study the diversity of *Nitrobacter*-like *nxrA* sequences in soil. *FEMS Microbiol Ecol* **63**: 261-271.
- Wertz, S., Degrange, V., Prosser, J.I., Poly, F., Commeaux, C., Guillaumaud, N., and Le Roux, X. (2007) Decline of soil microbial diversity does not influence the resistance and resilience of key soil microbial functional groups following a model disturbance. *Environ Microbiol* **9**: 2211-2219.

---

## **Etude en microcosme de la réponse de la communauté bactérienne nitratante à des changements de conditions environnementales**

---

Suite aux changements de pratiques agricoles, nous avons pu observer que la réponse de l'activité de nitratisation était fortement corrélée à celle des effectifs des bactéries nitratantes mais également au carbone organique total et à la disponibilité en nitrites.

Afin d'identifier les facteurs déterminants dans la réponse de l'activité de nitratisation face aux changements de pratiques de labour, nous avons mis en place une étude en microcosme. Des sols NN et TT ont été incubés en présence de carbone organique (pyruvate) ou de nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ). Des ajouts de ces substrats ont été réalisés tous les 3 jours (1g/L de pyruvate et 10ppm de  $\text{NaNO}_2$ ). En même temps, des sols témoins ont été incubés avec de l'eau. L'activité de nitratisation a été mesurée en début d'incubation, puis 2 semaines et 1 mois après les ajouts.

### ***Résultats 2 semaines après les apports***

L'activité de nitratisation dans les microcosmes contrôles des sols NN était significativement supérieure à celle des sols TT (Fig. 1) comme nous l'avons observé in situ. L'ajout de carbone organique a entraîné une hausse significative de l'activité uniquement dans l'horizon 0-5cm des sols NN.

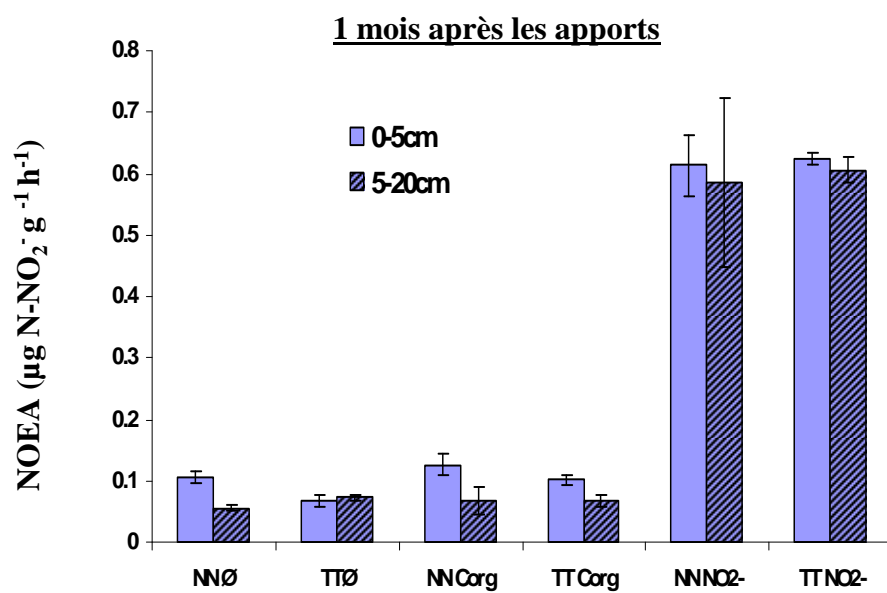
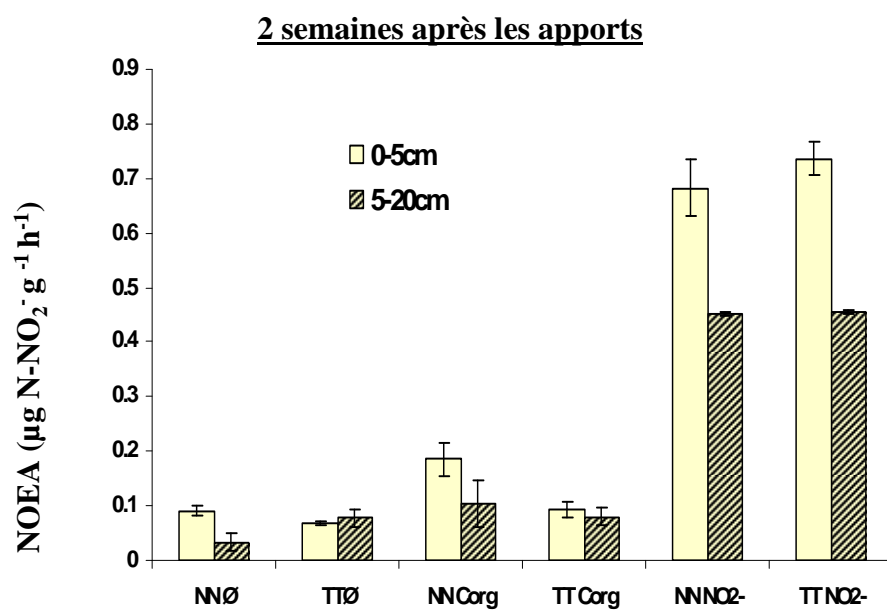
L'ajout de nitrite a entraîné une hausse significative et très forte de l'activité dans tous les microcosmes (NN 0-5 et 5-20cm, TT 0-5 et 5-20cm). Cette hausse a été bien plus marquée dans les sols provenant de l'horizon 0-5cm.

### ***Résultats après 1 mois d'incubation***

L'activité de nitratisation dans les microcosmes témoins des sols NN était toujours significativement supérieure à celle des sols TT (Fig. 2).

A cette date, l'apport de carbone organique a entraîné une faible mais significative hausse de l'activité nitratante dans l'horizon 0-5 cm des sols NN. Cette faible hausse est également détectable pour le même horizon dans les sols TT mais sans être significative.

Par rapport au prélèvement réalisé à T2 semaines, l'ajout de nitrite a entraîné une hausse significative et forte de l'activité dans tous les microcosmes provenant de l'horizon 5-20cm jusqu'à atteindre les mêmes valeurs que dans l'horizon 0-5cm.



**Figure 1** : NOEA (Nitrite oxidizing enzyme activity) des sols issus des 2 horizons des sols non labourés (NN) et labourés (TT) amendés en carbone organique ou nitrite depuis 2 semaines et 1 mois

### ***Discussion des résultats***

On peut noter tout d'abord que l'activité potentielle de nitratisation réagit assez vite à des modifications (ici assez profondes il est vrai) de la disponibilité en azote ou carbone organique, puisque des modifications importantes de cette activité potentielle sont détectées au bout de 15 à 30 jours d'incubation. Très peu d'informations existent en fait sur les délais de réponse de cette activité potentielle face aux conditions rencontrées dans le sol.

**La disponibilité en nitrite est apparue ici comme un facteur majeur pour déterminer l'augmentation de l'activité de nitratisation** à la fois dans les sols SDS et dans les sols LL. En effet, l'apport continu de nitrite a, en moins de 2 semaines, conduit à obtenir une activité nitratante dans l'horizon de surface équivalente entre les sols NN et TT, alors que, *in situ*, une grande différence était détectée pour toutes les dates de prélèvements. De plus, 1 mois après l'apport continu de nitrite, la stratification verticale observée *in situ* entre les 2 horizons pour les activités mesurées dans les sols NN a disparu (dans l'horizon 5-20cm des sols NN, l'activité de nitratisation est devenue aussi forte que dans les sols provenant de l'horizon 0-5cm). Cependant, cette stratification était toujours présente au prélèvement réalisé à t2 semaines. On peut donc supposer, qu'en plus de l'augmentation de la disponibilité en nitrite, il a fallu un changement de la structure et/ou d'abondance de la communauté nitratante pour que le niveau d'activité augmente autant.

**L'amendement continu en carbone organique est également apparu comme un facteur pouvant déterminer les niveaux de nitratisation, mais de manière plus subtile.** De plus, suite à cet apport de carbone organique, la nitratisation est plus augmentée dans l'horizon de surface des sols NN que dans les sols TT. L'impact de l'apport de carbone organique peut s'expliquer par 2 hypothèses. Tout d'abord, il a pu agir directement en stimulant l'activité des populations nitratantes qui sont en effet pour certaines capables de croître en mixo- et hétérotrophie. Cet apport de carbone organique 'frais' a pu également stimuler la minéralisation de l'azote et donc fournir, indirectement, une plus grande disponibilité en azote aux nitrifiants. Malheureusement, nous n'avons pas réalisé de mesures de flux bruts de minéralisation et nous ne pouvons pas conclure clairement sur l'effet du carbone organique : stimule-t-il l'activité de certaines populations nitratantes ou est-ce le nitrite le seul facteur expliquant les changements d'activités ? Il n'en reste pas moins que cette expérience au laboratoire montre, de façon cohérente aux conclusions de nos travaux de terrain sur le site de Boigneville, que la **disponibilité en substrats azotés est très probablement le facteur majeur pour le niveau d'activité de nitratisation.**



## **Chapitre 4**

**Etude de l'impact de changements de mode de  
gestion dans des agroécosystèmes sur l'activité,  
l'abondance et structure de la communauté  
dénitrifiante**



---

## **4<sup>ème</sup> chapitre : Etude de l'impact de changements de mode de gestion dans des agroécosystèmes sur l'activité, l'abondance et structure de la communauté dénitrifiante**

---

### **Préambule**

Pour des raisons environnementales (séquestration de carbone, réduction de l'érosion, amélioration de la fertilité des sols...) certains changements de mode gestion tels que les alternances prairie/culture et la réduction du labour ont tendance à se développer depuis ces dernières décennies. Cependant, les bénéfices environnementaux apportés par ces changements de gestion peuvent être neutralisés par les effets négatifs qu'ils engendrent, par exemple en terme d'émissions de N<sub>2</sub>O (supérieures dans les sols prairiaux et dans les cultures non labourées, voir par exemple Dobbie et Smith 2003 ; Baggs et al. 2003 ; Liu et al. 2006 ; Oorts et al. 2007). Ces émissions de N<sub>2</sub>O sont principalement le résultat du processus de dénitrification réalisé par les bactéries dénitrifiantes. De nombreux travaux ont été réalisés pour étudier les caractéristiques de la communauté bactérienne dénitrifiante dans différents modes de gestion (voir la revue de Philippot et al. 2007), mais la réponse de cette communauté après des changements de mode de gestion reste largement à élucider.

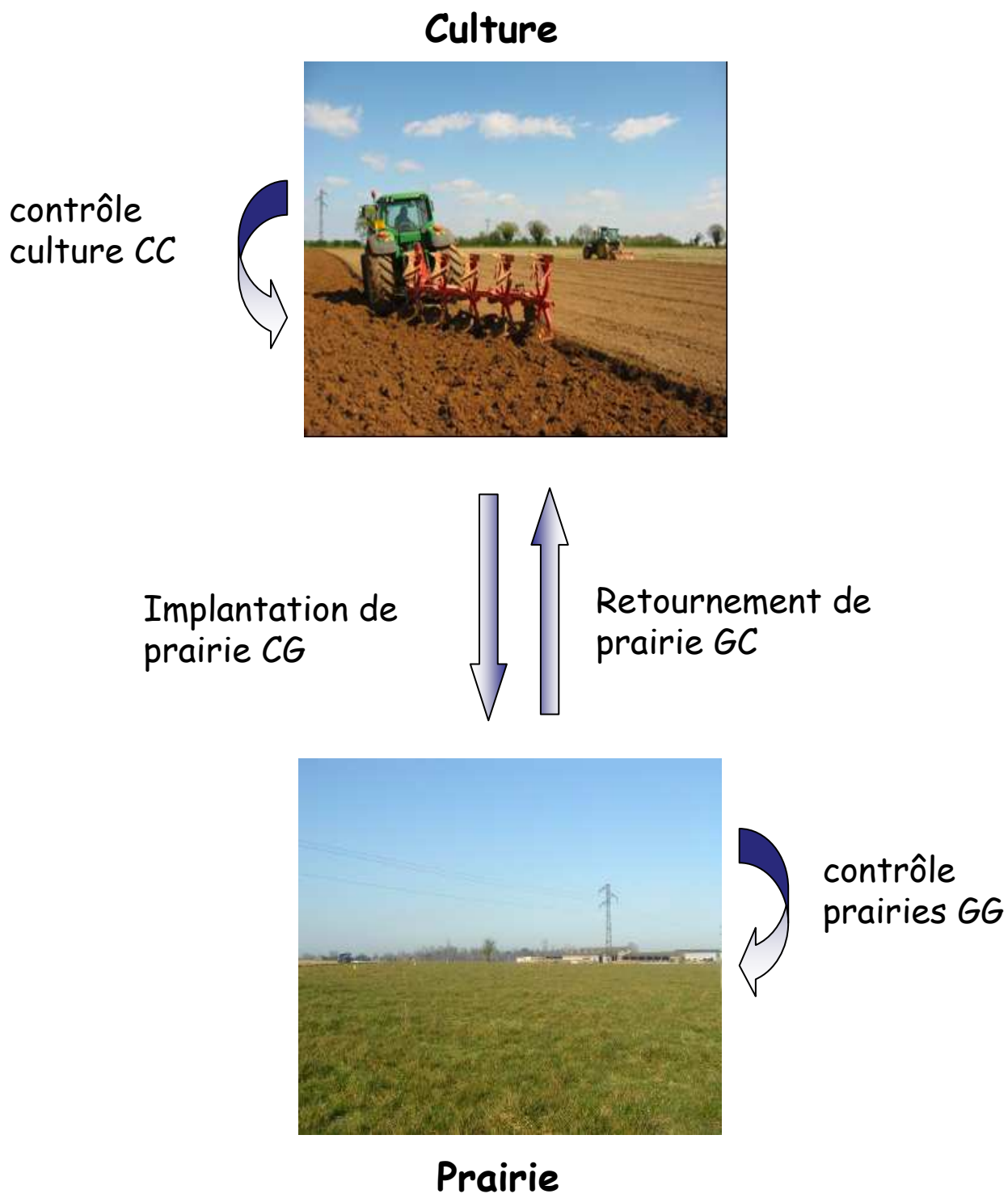
### **Démarche d'étude**

Dans ce contexte nous avons choisi d'étudier 2 situations différentes de changements de mode de gestion dans les systèmes cultivés. En combinant ces 2 sites, nous souhaitons identifier les facteurs communs et différents selon le site qui pilotaient la réponse de la communauté bactérienne dénitrifiante après les changements de mode de gestion.

Notre étude a ainsi été réalisée sur :

- un site ORE (Observatoire de Recherche en Environnement) où nous avons étudié le rôle de l'introduction de prairies temporaires dans des rotations culturales. Ceci nous a permis d'étudier les effets de (i) l'implantation d'une prairie sur des sols initialement cultivés, et (ii) l'implantation d'une culture sur des sols initialement sous prairie. La moitié des sols a conservé sa gestion initiale (sols contrôles « culture » et « prairie ») ;
- le site de Boigneville (présenté dans le chapitre précédent) où nous avons étudié les effets des changements de mode de travail du sol (labour/non labour).





**Figure 1:** Schéma des changements de mode de gestion appliqués sur les sols de l'ORE du site de Lusignan (INRA Lusignan)

Nous avons suivi pendant presque 2 ans à Boigneville et 3 ans à Lusignan, la dénitrification potentielle, les effectifs, la structure de la communauté dénitrifiante (en ciblant le gène *NirK*) et des variables environnementales majeures par rapport aux exigences de cette communauté i.e. le carbone organique, le nitrate et l'humidité.

Dans les travaux présentés ici, nous avons évalué l'humidité par une mesure gravimétrique. Cette mesure n'étant pas le meilleur indicateur des conditions d'oxygénation pour les bactéries dans le sol, nous avons prévu d'utiliser, dans la version du papier qui sera soumise, des données plus adaptées pour correctement estimer le niveau d'anaérobiose par le calcul du pourcentage de la porosité remplie par de l'eau (water filled pore space, WFPS, en anglais), dès que nous auront les données nécessaires pour convertir l'humidité gravimétrique en WFPS.

Certaines données (effectifs de la communauté dénitrifiante, variables environnementales) correspondant au dernier point de prélèvement réalisé en mars dernier sont en cours d'acquisition et ne seront donc pas présentées ici.

### **Objectifs :**

Notre but principal était de déterminer les effets des 2 changements de mode de gestion sur la communauté bactérienne dénitrifiante. Plus précisément, nous souhaitons:

- (i) déterminer l'amplitude et le temps de réponse de la communauté bactérienne dénitrifiante soumises à ces changements de gestion ;
- (ii) déterminer dans quelle mesure les changements de dénitrification potentielle pouvaient être expliqués par les changements d'effectifs et/ou de structure génétique de cette communauté et/ou par les changements de variables environnementales clés (carbone organique, nitrate, humidité) ;
- (iii) hiérarchiser l'importance de tous ces facteurs sur la dénitrification potentielle grâce à une méthode statistique appropriée (GLM).

Cette étude sera soumise prochainement à la revue *Global Change Biology*.

### **Principaux résultats et conclusion**

La dénitrification potentielle dans les premiers centimètres des sols sous prairie (Lusignan) et non-labourés (Boigneville) était significativement plus forte que dans les couches de sol plus profondes.



Le labour de sols initialement en prairie ou non labourés a entraîné une baisse rapide de la dénitrification potentielle due au mélange des couches de sol par le labour. A l'inverse, l'installation de prairie et l'arrêt du labour n'a pas causé d'augmentation de la dénitrification potentielle sur les 2-3 années de notre suivi.

Les changements observés sur la dénitrification potentielle ne résultaient pas de changements de la structure génétique de cette communauté ; par contre, ils étaient liés, au moins partiellement, à des changements d'effectifs des bactéries dénitrifiantes. L'humidité du sol et la teneur en nitrate étaient impliquées dans les changements de dénitrification mais le principal effet provenait plutôt des changements de teneur en carbone organique. Ces changements de teneur en carbone organique ont pu agir directement sur la dénitrification potentielle mais également indirectement en permettant l'augmentation des effectifs des dénitrifiants et en accroissant la capacité de rétention d'eau par le sol.

Nos résultats démontrent qu'après des changements de mode de gestion dans ce type d'agroécosystèmes, les modifications de dénitrification potentielle sont plus pilotées par des changements de variables environnementales comme le carbone organique notamment que par les changements d'effectifs des bactéries dénitrifiantes ou que les changements de structure de la communauté bactérienne dénitrifiante.



**Soil environmental variables rather than denitrifier abundance and diversity drive potential denitrification after changes in land-use and tillage practices**

E. ATTARD<sup>1</sup>, S. RECOUS<sup>2,3</sup>, F. LAURENT<sup>4</sup>, A. CHABBI<sup>5</sup>, B. SCHMID<sup>6</sup> & X. LE ROUX<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> *Laboratoire d'Ecologie Microbienne, Université de Lyon, Université Lyon 1, UMR CNRS 5557, USC INRA 1193, bât. G. Mendel, 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne, France*

<sup>2</sup> *INRA, UR1158 Unité d'Agronomie, rue F. Christ, F-02000 Laon, France*

<sup>3</sup> *present adress : UMR614 INRA-URCA FARE, 2 esplanade Roland Garros, 51000 Reims, France.*

<sup>4</sup> *ARVALIS Institut du Végétal, 91720 Boigneville, France*

<sup>5</sup> *INRA-UEFE, Les Verrines, 86 600 Lusignan, France*

<sup>6</sup> *Institute of Environmental Sciences, University of Zurich, Winterthurerstrasse 190, 8057 Zurich, Switzerland*

Running title: Denitrifiers response to land-use changes

\* Corresponding author:

*tel:* (33) 4 72 43 13 79

*fax:* (33) 4 72 43 12 23

*email:* [leroux@biomserv.univ-lyon1.fr](mailto:leroux@biomserv.univ-lyon1.fr)



Keywords (10): denitrifying bacteria, no-till, N<sub>2</sub>O emission, temporary grassland, soil organic carbon, nitrate

### ***Abstract***

Concern on global change has led to change land-use practices which benefits could be counterbalanced by increase in N<sub>2</sub>O emissions, a powerful greenhouse gas. In this context, our aim was to investigate the effect of two widespread land-use changes on the bacterial denitrifying community which is largely involved in production of N<sub>2</sub>O emissions. We studied, during 2 years, two different agricultural systems (i) changes in land-use including crop/grassland conversion and (ii) changes in tillage practices including cessation or application of tillage. Long term grassland and no-tilled management have generated a vertical distribution with highest denitrification potential in the first ten centimeters of the soil layer. Ploughing grassland to establish crop systems and application of tillage on crops previously untilled led to rapid changes in denitrification potential which were likely due to the tillage-induced soil mixing. In contrast, establishment of grasslands on previous cropping systems and cessation of tillage did not result in any significant changes on the denitrification potential which will probably require a long-time to set-up the vertical distribution. Changes in the structure of the denitrifier community could not explain the observed changes in denitrification potential whereas changes in denitrifier abundance were partially involved. Although moisture and nitrate played a role, the main driver of the changes in denitrification potential after the changes in land-use was soil organic carbon which could influence directly the denitrification potential or indirectly promoting growth of denitrifiers and enhancing water holding capacity. Our results highlighted the strong coupling between carbon and nitrogen cycles and the importance to take into account both of them to understand the effects of changes in land-use and tillage practices on the agroecosystems.





## ***Introduction***

The current concern on global change has highlighted the importance of the carbon cycle in the prevision of future climatic scenarios (Robert, 2002). An option to mitigate the impact of increased greenhouse gas emissions is to enlarge the carbon storage capacity of the terrestrial biosphere, which largely depends on land-use and management factors (Balesdent et al. 2000). Land-use changes will also probably represent the main determinant of biodiversity changes during the forthcoming century (Sala et al. 2000). Among various land-use changes, establishment of temporary grasslands in crop rotation and reduction or suppression of soil tillage have concerned an increasingly large area of cropped land in temperate areas. Temporary grasslands in crop rotation is used for livestock breeding, to control pests and weeds and to improve soil fertility. Reduction of tillage has spread fastly during the last decades to prevent erosion, to reduce labor and machinery use and to increase soil carbon sequestration although this last point sometimes remains controversial (Holland 2004; USDA 2001; Wang et al. 2007).

However, environmental benefits of such land-use changes could at least be partially counterbalanced by their negative effects on N<sub>2</sub>O emissions. Indeed, increased N<sub>2</sub>O emission from soil was observed in no-till crop systems, when compared to the same but tilled systems (Baggs et al. 2003; Liu et al. 2006; Liu et al. 2007; Oorts et al. 2007; Six et al. 2004). Higher N<sub>2</sub>O emission from soils has also been observed in ungrazed grassland than arable land (Dobbie and Smith 2003).

N<sub>2</sub>O emissions from soils are mainly the result of the denitrification, a process realised mainly by denitrifying bacteria. However, despite their crucial importance in N<sub>2</sub>O emissions, information on the response of these biological actors to land-use changes is scarce : in particular, the key determinants of their response and the time-scale of their response are still unclear. Some studies have analysed the response of the soil system and its microbial component, although without focusing on denitrifiers. For instance, Pankhurst et al. (2002) focused on the effect of change in tillage practices on soil bacterial community, but not specifically on denitrifiers. Besides, numerous other studies have analysed the response of the soil denitrifying community to agricultural practices (Philippot et al. 2007), but not in the context of changes in land-use. Cavigelli and Robertson (2000) compared denitrification in conventional and no-tilled systems but did not look at the effects of changes and the establishment over time of differences between the two systems. Moreover, if after disturbances such as land-use changes, changes in N<sub>2</sub>O emissions are observed, drivers implicated in these modifications are still unknown i.e. (i) in what extent denitrification



changes are linked to changes in denitrifiers abundance and/or in specific activity (activity per individual cell) and/or in denitrifier community diversity and (ii) among several key environmental variables (organic carbon, moisture, nitrate) which is the most relevant to explain changes in denitrification.

In this context, our aim was to investigate the effect of land-use changes on the bacterial denitrifying community. To do so, we studied two different agricultural systems involving soil ploughing or cessation of soil ploughing: (i) rotation including crops and temporary grasslands which implies the establishment of grasslands on previously crop system, or the destruction of temporary grassland for cropping and (ii) choice of soil management in arable systems which implies tillage or the suppression of tillage. Studying both situations, we aimed at identifying common and site-specific factors that drive the response of the soil denitrifying community to land-use changes in cropping systems.

Our specific objectives were: (i) to determine the amplitude and the time-scale of the response of the denitrifying community to land-use changes (ii) to determine to what extent changes in soil denitrification potential could be explained by changes in the abundance and/or the genetic structure of this community and by soil environmental factors (moisture, nitrate, organic carbon content); our objective was to hierarchise the importance of all these driving factors, accounting for changes in both environmental factors and denitrifying community characteristics thanks to an adequate statistical analysis (GLM).

## ***Material and methods***

### **Study sites, treatments and soil sampling**

Two experimental sites were used, one located at Lusignan (western France) on a long-term experimental site of INRA (National Institute of Agronomic Research). The second one was located at Boigneville (northern France) on the long term experimental site of Arvalis.

#### **Lusignan site**

At Lusignan, the soil is a Brunisol (FAO-UNESCO 1987) with a deep clay layer (Tab. 1). Eight plots (70 x 50m) that had been continuously cultivated for 5 years and 8 plots (20m x 12m) under grassland for 5 years (G) were studied. In mid-March 2005, half of the plots (i.e. 4 annual crop plots and 4 grassland plots) were submitted to a shift in land-use. Half of the previously grassland plots were ploughed to install a maize crop. Half of the plots previously cropped were planted with a mixture of tall fescue, *dactylis glomerata* and italian

**Table 1** : Soil characteristics and N<sub>2</sub>O emission rates at Lusignan and Boigneville site. N<sub>2</sub>O emissions were measured by Oorts et al. (2007) in spring, one year before the beginning of our experiment. Different letters mean indicate values significantly different at p<0.05 at each site. ND : no data.

	Lusignan site		Boigneville site	
	GG	CC	NN	TT
Organic carbon content (mg.g <sup>-1</sup> )	17.7 a	11.4 b	18.7 a	14.3 b
Microbial biomass (ug.g <sup>-1</sup> )	525 a	302 b	395 a	288 b
Clay (<2um) (g.kg <sup>-1</sup> )	167	156	248	230
Silt (2-50um) (g.kg <sup>-1</sup> )	602	578	647	668
Sand (50-2000um) (g.kg <sup>-1</sup> )	194	208	66	59
N <sub>2</sub> O emissions (g N <sub>2</sub> O-N ha <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	ND	ND	0.3 a	0 b

raygrass. Grasslands and crops did not experience the same fertilization and pesticide management. This resulted into 4 treatments: continuous annual crop rotation (CC), continuous grassland (GG), shift from arable crops to grassland (CG), shift from grassland to arable crops (GC). Annual crops underwent a maize-wheat-barley rotation. The second and third tillages for the CC and GC treatments, occurred in October 2005 and October 2006, respectively (8 and 18 months after experiment start) on 30cm depth.

Soils were first sampled just before the changes in land-use practices in March 2005. Soil was then sampled 3.5, 12 and 24 months after the changes in land-use practices. For each date, 10 soil cores were randomly sampled in the 0-10cm and 10-30cm layer of each plot. For each plot and each layer, the soil cores were pooled and sieved at 2mm. Soil was stored a few days at 4°C before denitrification potential C and N content assays. A sub-sample of fresh soil was stored at -18°C for molecular analyses.

#### Boigneville site

At Boigneville, the soil is a Haplic Luvisol (FAO-UNESCO 1987) with a deep loam overlying cracked calcareous material. We used 8 plots (5 x 48m) that had been under tillage since 1991 (for 14 years at the start of the experiment) and 8 plots under no tillage (N) since 1991. All plots underwent a barley-pea-wheat continuous rotation and received the same amounts of fertilizers and pesticides. In mid-November 2005, half of the plots were submitted to a shift in their management practices: 4 of the 8 plots previously not tilled were ploughed (20cm depth); and 4 of the 8 plots previously ploughed once a year were shift to no-till management. This resulted into 4 treatments : no-till as a control (NN), tillage as a control (TT), shift from no-till to till practice (NT), and shift from till to no-till practice (TN). The second tillage event occurred in October 2006 at Boigneville (12 months after experiment start) for the TT and NT treatments. For each date, 10 soil cores were randomly sampled in the 0-5cm and 5-20cm layers per plot. Soils were first sampled just before the changes in tillage practices in November 2005. Soil was then sampled 0.5, 3.5, 11 and 17 months after the changes in tillage practices. Soil samples were homogenised and stored as described above before activity and C and N assays.

#### **Denitrification potential assays**

The method used for denitrification potential measurements was as described by Patra et al. (2005), using 3 g of soil per sample. Briefly, denitrification potential was determined as the rate of production of N<sub>2</sub>O during short-term (8 h) incubation under anaerobiosis using a



gas chromatograph (Agilent P200, USA). Acetylene ( $C_2H_2$ ) was used to inhibit nitrous oxide reductase activity, and no accumulation of nitric oxide was detected.  $KNO_3$  (200  $\mu g$  of  $NO_3^-$ -N per gram of dry soil), glucose (0.5 mg of C per gram of dry soil) and glutamic acid (0.5 mg of C per gram of dry soil) were added to the soil samples and the soil moisture was brought to 100% water holding capacity.  $N_2O$  concentration in the flush atmosphere was measured at 2, 4, 6 and 8h. A linear rate of  $N_2O$  production was always observed.

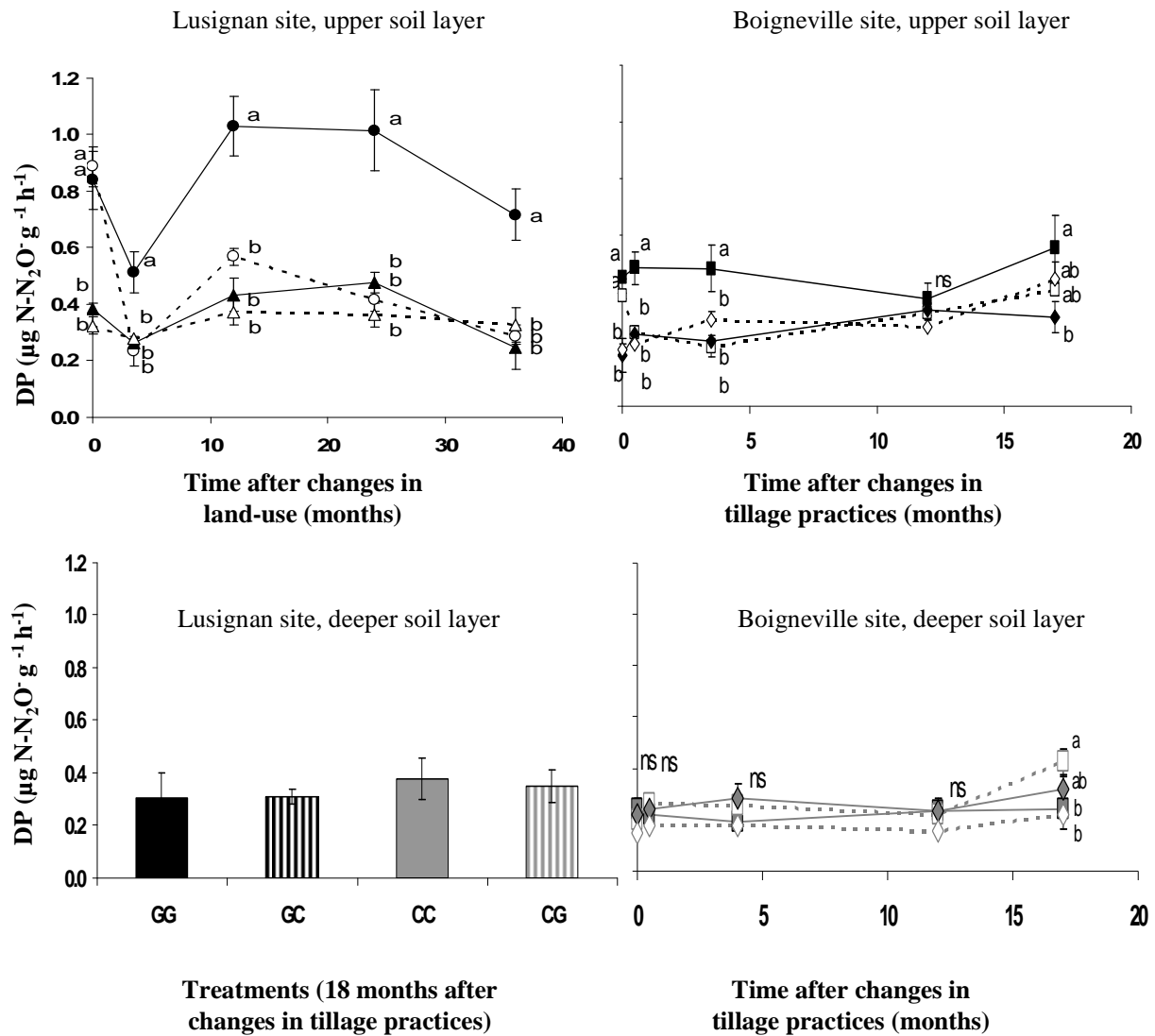
### **Soil DNA extraction and characterization of the denitrifying community structure by PCR-DGGE**

DNA was extracted for each frozen soil sub-sample using the PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA). The genetic structure of the denitrifying bacterial community was characterised by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of *nirK* gene fragments according to Wertz et al. (2006), using the primers of Liu et al. (2003). *NirK* is a key functional gene coding for nitrate reduction. Briefly, PCR was performed using 30 ng of DNA extract. The final reagent concentrations for PCR were 1  $\mu M$  primers, 200  $\mu M$  of each dNTP, 1.75 U of Taq (Qbiogene, Carlsbad, USA), in 50  $\mu l$  of 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 1.5 mM  $MgCl_2$ , pH 9 (0.5  $\mu g$  of T4 protein was added only for the first step). Thermocycling conditions were similar to those used by Wertz et al. (2006). Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of PCR products employed the D-Code Universal Mutation Detection System (Bio-Rad) with a 6% polyacrylamide gel containing a gradient of 35–65% denaturant, 100% denaturing solution being defined as 7 M urea and 40% formamide. Gels were run for 4.5 h at 150 V in 1 $\times$  TAE buffer at 60°C. Gels were stained with Sybrgreen (Roche, Meylan, France) and then photographed with a UV source system (Fischer Bioblock Scientific, Illkirch, France) using the software BiocaptMW (Vilber-Lourmat, France). DGGE banding profiles from all soil samples were analysed using Gel ComparII software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) to obtain a matrix consisting of the relative intensity and position of each band.

### **Measurement of *nirK* copy abundance by quantitative PCR**

Quantitative PCR assays were carried out from soil DNA with Lightcycler 480 (Roche Diagnostics, Meylan, France) according to Henry et al. (2004) with primers (5'–3') *nirK876* (ATY GGC GGV CAY GGC GA) and *nirK1040* (GCC TCG ATC AGR TTR TGG TT) (Henry et al. 2004). The 20 $\mu L$  final volume PCR mix contained (final concentrations) QuantiTect SybrGreen PCR Master Mix 1X (Qiagen, Courtaboeuf, France), 1 $\mu M$  of each





**Figure 1:** Temporal variations in denitrification potential, DP, after (left) changes in land-use practices in the Lusignan site, and (right) changes in tillage practices in the Boigneville site. For Lusignan site ●: grassland control (GG), ○: conversion from grassland to crop (GC), ▲: crop control (CC), △: conversion from crop to grassland (CG). For Boigneville site 0-5cm layer ■: no-tillage control (NN), □: application of tillage on previously untilled soils (NT), ◆: tillage control (TT), ◇ cessation of tillage on previously tilled soils (TN). For Boigneville site 5-20 cm layer same symbols as in the 0-5cm layer but in grey. Bars are standard errors (n=4). For each date, values with different letters differ significantly with  $p < 0.05$ .

primers, 0.4 µg of T4 protein and 5 ng of soil DNA extract or 5µL of tenfold standard serial dilutions ranging from  $10^7$  to  $10^2$  *nirK* copies of three linearized plasmids containing different *nirK* genes from environmental samples (Henry et al. 2004). Thermal cycling was carried out in the same conditions as described by (Henry et al. 2004) except than the last cycle with an annealing temperature of 58°C was repeated 45 times. Melting curves and amplified *nirK* fragment length observed after agarose gel running of randomly chosen final PCR products were used to check amplification specificity.

### **Measurements of soil nitrate and organic carbon contents**

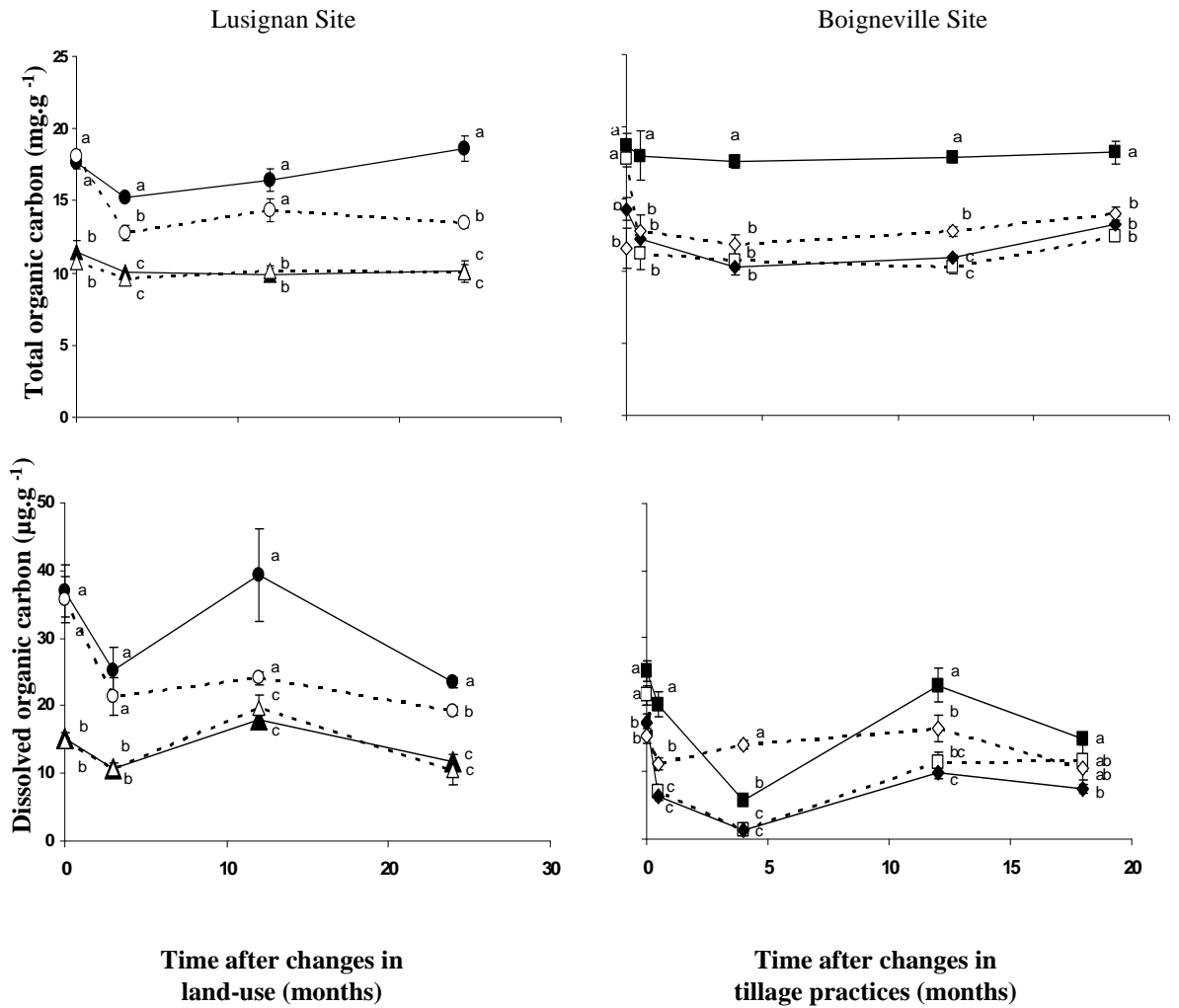
For each soil sample and each date, soil moisture (w/w) was measured on a sub-sample (around 7 g) of each fresh soil sample. The soil mineral nitrogen ( $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$ ) was extracted with 1M KCl (1:3 soil/solution ratio). The extract was centrifuged for 15min at 5,800\*g and filtered on a Durieux No.3 paper disc. The mineral N in the soil extracts was analysed by continuous flow colorimetry (TRAACS 2000, Irama corp, Milwaukie, USA). The  $\text{NO}_3^-$  concentration was determined as described by Kamphake et al. (1967) and  $\text{NH}_4^+$  concentration as reported by Krom (1980). Total C concentration of each soil sample was measured using an elemental analyser (NA 1500, Carlo Erba, Val de Reuil, France). Microbial biomass was determined by chloroform-fumigation from the protocol of Vance et al. (1987). The extraction of soluble organic carbon from soils sample fumigated or not was performed with 40 mL of  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0.03M (soil-solution 1:4, agitation 30 min, 20°C). The concentration of soluble organic carbon was measured with an C-analyser (1010, O.I. analytical, Globalspec, NY, USA). Microbial biomass was calculated from the difference between fumigated and non-fumigated C or N using a correction factor of 0.38.

### **Data analyses and statistical tests**

Fisher's test was used to determine if denitrification potential means differed significantly between treatments at each date. Pearson's test was used to determine if the correlations between denitrification potential and (i) the *NirK* copies, (ii) total organic content and (iii) moisture, were significant.

To analyse matrices obtained from DGGE banding profiles, the total band intensity for each lane was normalised among lanes and data were square root-transformed. Denitrifying community matrices were analysed using primer software (PRIMER-E Ltd, Plymouth, UK).

For each date and each site, the correlation between denitrification potential and the genetic structure of the denitrifying community was tested by quantifying the correlation



**Figure 2:** Temporal variations in total and dissolved organic carbon concentrations in the upper soil layer after (left) changes in land-use practices in the Lusignan site, and (right) changes in tillage practices in the Boigneville site. For Lusignan site ●: grassland control (GG), ○: conversion from grassland to crop (GC), ▲: crop control (CC), △: conversion from crop to grassland (CG). For Boigneville site ■: no-tillage control (NN), □: application of tillage on previously no-tilled soils (NT), ◆: tillage control (TT), ◇: cessation of tillage on previously tilled soils (TN). Bars are standard errors (n=4). For each date, values with different letters differ significantly with  $p < 0.05$ .

between the rank similarity matrices obtained for activity on the one hand and genetic structure on the other hand (Spearman correlation coefficient and associated significance level with a permutation test using 5000 permutations) (Clarke and Ainsworth 1993).

For all dates, general linear model analysis was used to evaluate and hierarchise the effects of explanatory factors (denitrifiers abundance and soil organic carbon, moisture, nitrate) on the denitrification potential level.

## **Results**

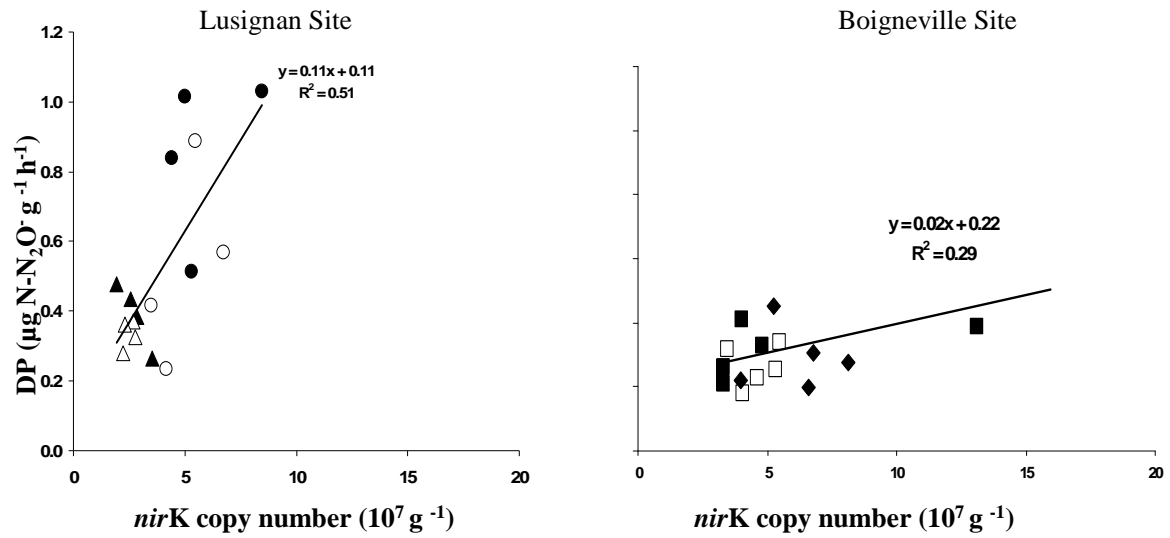
### ***Effects of changes in land-use on denitrification potential***

On Lusignan site, denitrification potential in the 0-10 m layer was approximately 2-fold higher in control grasslands (GG) than in control cropping systems (CC) at all sampling dates (Fig. 1). At the first sampling date (i.e. 3.5 months after the changes in land-use), denitrification potential in soils converted from grassland to crop (GC) was similar to those observed in control crops (CC) (Fig. 1). At the opposite, conversion from crops to grasslands did not affect significantly the denitrification potential, which remained equal in CG and CC treatments for all the duration of the experiment (Fig. 1). In the 10-30cm soil layer, denitrification potential did not significantly differ between the 4 treatments and were close to values observed in the 0-10cm layer for the CC treatment (Fig. 1).

In a similar way, at Boigneville site, denitrification potential in the 0-5cm soil layer was approximately 1.5 to 2-fold higher in no-tilled (NN) than in tilled (TT) systems at almost all sampling dates (exception at 11 months) (Fig. 1). Two weeks after the changes in tillage practices, denitrification potential values in newly tilled soils (NT) were similar to those observed in control tilled soils (TT) (Fig. 1). At the opposite, cessation of tillage did not affect significantly the denitrification potential which remained unchanged in TN soils as compared to control tilled soils TT for all the duration of the experiment (Fig. 1). In the 5-20cm soil layer, denitrification potential did not significantly differ between treatments and was close to values observed in the 0-5cm layer for the TT control treatment (Fig. 1).

### ***Effects of changes in land-use on total and dissolved organic carbon***

In both sites, total organic carbon (TOC) in the upper soil layer remained constant over the duration of the experiments for the 2 control treatments, and was twice higher in grasslands (GG) and no-tilled systems (NN) than in cropping systems (CC) and tilled systems (TT), respectively (Fig. 2 top).



**Figure 3:** Correlation between denitrification potential, DP, and denitrifier abundance (assessed by *nirK* copies). The correlation includes all treatments for all dates. For symbols, see Fig.1

**Table 2:** Significance level (p values) and strength of the correlation (Spearman coefficient,  $\rho$ ) between denitrification potential and genetic structure of the denitrifying community at each date after the changes in land-use and tillage practices.

ND: non determined.

Lusignan (changes in land-use)			Boigneville (changes in tillage practices)		
Time (months)	$\rho$	p values	Time (months)	$\rho$	p values
3.5	0.27	<b>0.02</b>	0.5	0.35	<b>0.02</b>
12	0.65	<b>0.001</b>	3.5	-0.01	0.51
ND	ND	ND	12	0.04	0.32
24	0.18	0.13	17	-0.02	0.91

Dissolved organic carbon (DOC) in Lusignan site was more variable than TOC but treatment effects were similar for DOC than TOC (Fig. 2 bottom). DOC at Boigneville site was variable with time, but DOC was always higher in NN than TT soils (Fig. 2 bottom).

Establishment of crops on previous grasslands (GC) and application of tillage on previous no-tilled systems (NT) caused a significant and a strong decrease in TOC. Such a decrease was observed for DOC in Lusignan site only 12-24 months after land-use changes and a tendency was observed in Boigneville site. Establishment of grasslands on previous crops (CG) and cessation of tillage on previous tilled crops (TN) did not lead to any significant changes in TOC and DOC.

In the 10-30cm soil layer of Lusignan site and in the 5-20cm of Boigneville site, TOC and DOC did not significantly differ between treatments (not shown) and were close to values observed in the 0-10cm layer for the CC control treatment and 0-5cm layer for the TT control treatment, respectively.

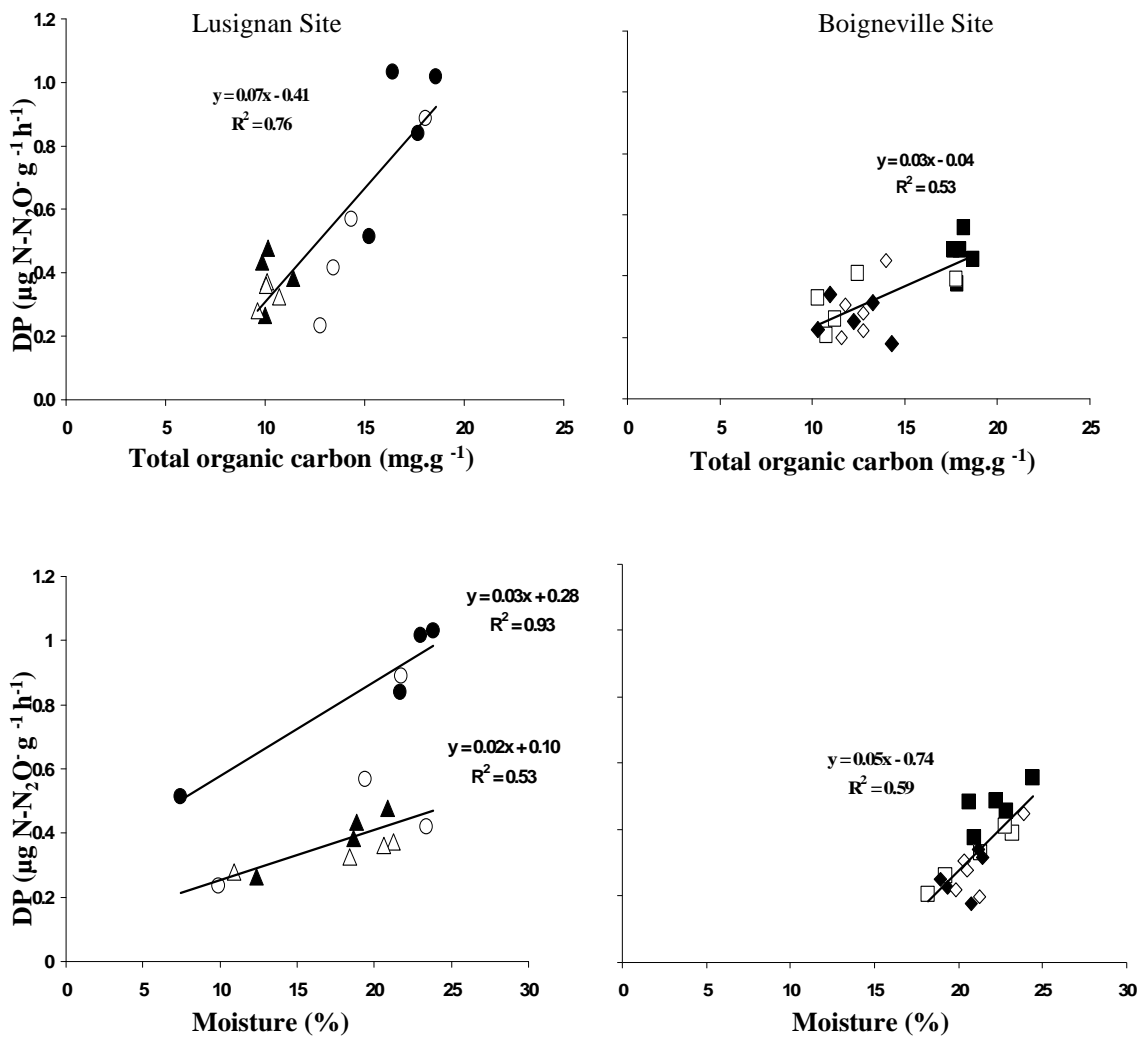
### ***Relationship between denitrification potential and the genetic structure and the size of the denitrifying community***

The genetic structure of the denitrifying community always significantly differed between control treatments (*i.e.* GG *versus* CC at Lusignan, and NN *versus* TT at Boigneville) (appendix 1). Both changes in land-use and tillage practices led to significant changes in the community structure that were observed as soon as the first sampling date after the change in land-use or tillage practices (3.5 months at Lusignan and 0.5 month at Boigneville) (appendix 1).

At the Lusignan site, denitrification potential levels and denitrifying community structures were significantly correlated for 2 sampling dates but only weakly with  $\rho$  values ranging from 0.27 to 0.65 (Tab. 2). At the last sampling date, no significant correlation was observed.

At Boigneville site, denitrification potential levels and denitrifying community structure were not significantly correlated for the last 3 sampling dates. A significant correlation was observed only for one sampling date (0.5 month) although the correlation was weak ( $\rho$  value of 0.35) (Tab. 2).

In both sites, denitrification potential was significantly correlated with *nirK* copy number (Fig. 3). This correlation was stronger for Lusignan site ( $R^2=0.51$  and  $p=0.002$ ) than Boigneville site ( $R^2=0.29$  and  $p=0.014$ ). For all dates and all treatments, denitrifier abundance



**Figure 4:** Correlation between denitrification potential, DP, and (top) concentration of total organic carbon and (bottom) moisture for Lusignan site, and Boigneville site. The correlations include all treatments for all dates except for DP-moisture relationship for Lusignan site for which the correlation observed for grassland sites significantly differ from the correlation observed for the 3 other treatments. For symbols legend, see Fig. 1.

was well correlated with microbial biomass carbon (MBC) ( $R^2=0.485$  and  $R^2= 0.494$  for Lusignan and Boigneville sites, data not shown)

### ***Relationship between changes in denitrification potential and soil environmental variables***

In both sites, denitrification potential was significantly correlated with TOC and moisture (Fig. 4). More precisely, the relation between denitrification potential and TOC was particularly strong for Lusignan ( $R^2= 0.76$ ;  $p<0.001$ ) (Fig. 4 top, left). We also checked for the correlation between denitrification potential and DOC, which was weaker than the correlation observed with TOC (not shown). The relation between denitrification potential and moisture depended on the treatments : a strong correlation was observed ( $R^2=0.92$  ;  $p=0.009$ ) for grasslands (GG treatment and GC treatment at initial sampling time), and a significant but weaker correlation was observed for crops (CC, CP and PC treatments) ( $R^2=0.53$ ;  $p=0.011$ ). For Boigneville, a significant relation was observed between denitrification potential and total organic carbon ( $R^2= 0.53$ ;  $p<0.001$ ) (Fig. 4 top, left). We also checked for the correlation between denitrification potential and DOC, which was weaker than the correlation observed with TOC (not shown). The relation between denitrification potential and moisture was also significant ( $R^2=0.59$ ;  $p<0.001$ ) (Fig. 4 bottom, left).

### ***Unravelling relative effects of environmental factors and denitrifier abundance on denitrification potential***

Fitted as first explanatory term in a multiple regression analysis, the denitrifier abundance explained 51% ( $P<0.001$ ) and 29% ( $P<0.001$ ) of the variance for denitrification potential at Lusignan and Boigneville sites, respectively (Tab. 3). However, if other factors (moisture, organic carbon, nitrate) were used as first explanatory terms, the effect of denitrifier abundance was not significant anymore.

Nitrate when fitted as first explanatory term explained only 18% of variation in denitrification potential at Lusignan site and was not a significant term at Boigneville site (not shown).

When fitted as first explanatory term, soil organic carbon, explained 76% and 53% of the variation in denitrification potential for Lusignan and Boigneville, respectively (Tab. 3). When fitted as first explanatory term, moisture explained respectively 32% and 58% for Lusignan and Boigneville (Tab. 3).

Taking into account data for both sites and including an additional term for site effect in the GLM analysis, TOC was the main explanatory term and explained 48% of the variation



**Table 3** : Results of the General Linear Model analysis to evaluate the roles of soil organic carbon, moisture, nitrate, and denitrifier abundance on potential denitrification (DP). % s.s. = percentage of the total sum of squares explained by each variable. ns = not significant ( $P > 0.05$ ).

Lusignan site (changes in land-use)							
DP	P	% s.s	DP	P	% s.s	DP	% s.s
<i>NirK</i> abundance	<.001	<b>50.87</b>	<b>Moisture</b>	<.001	<b>32.10</b>	<b>Soil organic carbon</b>	<.001
<b>Soil organic carbon</b>	<.001	<b>26.03</b>	<b>Soil organic carbon</b>	<.001	<b>54.15</b>	<b>Moisture</b>	<b>0.01</b>
<b>Moisture</b>	<b>0.008</b>	<b>10.63</b>	Nitrate	ns		Nitrate	ns
Nitrate	ns		<i>NirK</i> abundance	ns		<i>NirK</i> abundance	ns
Total explained		87.53	Total explained		86.25	Total explained	86.25

Boigneville site (changes in tillage practices)							
DP	P	% s.s	DP	P	% s.s	DP	% s.s
<i>NirK</i> abundance	<.001	<b>28.82</b>	<b>Moisture</b>	<.001	<b>58.51</b>	<b>Soil organic carbon</b>	<.001
<b>Soil organic carbon</b>	<.001	<b>24.62</b>	<b>Soil organic carbon</b>	<.001	<b>11.60</b>	<b>Moisture</b>	<.001
<b>Moisture</b>	<.001	<b>16.70</b>	<b>Nitrate</b>	<.001	<b>19.23</b>	<b>Nitrate</b>	<.001
<b>Nitrate</b>	<.001	<b>20.45</b>	<i>NirK</i> abundance			<i>NirK</i> abundance	ns
Total explained		70.14	Total explained		89.34	Total explained	89.34

in denitrification potential when used as the first term (Tab. 4). When used as the first term in the analysis, moisture and denitrifier abundance explained 28% and 19% of the variation in denitrification potential, respectively.

### ***Discussion***

Denitrification is an important process contributing to emissions of N<sub>2</sub>O, and then to global warming due to the intense greenhouse power N<sub>2</sub>O. Therefore, in a context of frequent changes in land-use in agrosystems (notably crop/grassland and tillage/no-tillage conversion), we characterised the changes in denitrification and this key determinants. Although grassland/crop rotations are widely used, and although reduced of tillage practices widely spread, in our knowledge, no previous study have concerned the impacts of these common changes in management on the soil denitrifying community yet involved in economic and environmental issues.

### ***Changes of denitrification potential after changes in land-use and tillage practices***

Long term differentiation in soil use or soil management significantly influenced denitrification potential level, in the surface layer, denitrification potential being twice higher in the soil covered with grass as compared to arable crop soil (Lusignan), and in no-till soil as compared to tilled soil (Boigneville). The differences in denitrification potential observed at Lusignan site might be caused by the different agricultural practices between grasslands and crops, i.e. not only soil ploughing but also vegetation type, and pesticide and fertilizer supplies. However, the quick response of denitrification potential to grassland conversion to crop show that ploughing was the major factor explaining the low denitrification potential levels observed in tilled plots. At Boigneville, the only agricultural practice that differed between treatments was soil tillage. Our results at Lusignan site are consistent with previous studies that reported higher denitrification potential in grassland than crop soils (Bijay et al. 1989; Lensi et al. 1995). Comparing different tillage practices, Baggs et al. (2003) and van Bochove et al. (2000) have reported larger N<sub>2</sub>O emissions in no-tilled than tilled systems. Similarly, N<sub>2</sub>O emissions measured previously at Boigneville site (Oorts et al. 2007) were higher in NN than in TT soils, which is consistent with the observed denitrification potentials. Similarly, Petersen et al. (2008) reported higher denitrification potential and N<sub>2</sub>O emissions in reduced tillage as compared to tillage systems. We observed that grassland and no-tillage systems have generated a vertical distribution of denitrification potential (i.e. values twice

**Table 4** : Results of the General Linear Model analysis to evaluate the roles of soil organic carbon, moisture, nitrate, and denitrifier abundance on potential denitrification (DP) for both sites. % s.s. = percentage of the total sum of squares explained by each variable. ns = not significant ( $P > 0.05$ ).

Lusignan and Boigneville sites									
DP	P	% s.s	DP	P	% s.s	DP	P	% s.s	% s.s
<b>Site</b>	<.001	<b>19.58</b>	<b>Site</b>	<.001	<b>19.58</b>	<b>Site</b>	<.001	<b>19.58</b>	<b>19.58</b>
<b><i>NirK</i> abundance</b>	<.001	<b>19.02</b>	<b>Moisture</b>	<.001	<b>28.27</b>	<b>Soil organic carbon</b>	<.001	<b>48.01</b>	<b>48.01</b>
<b>Soil organic carbon</b>	<.001	<b>29.37</b>	<b>Soil organic carbon</b>	<.001	<b>29.42</b>	<b>Moisture</b>	<.001	<b>9.68</b>	<b>9.68</b>
<b>Moisture</b>	<.001	<b>9.48</b>	Nitrate	0.001	<b>4.56</b>	<b>Nitrate</b>	0.001	<b>4.56</b>	<b>4.56</b>
<b>Nitrate</b>	0.001	<b>4.40</b>	<i>NirK</i> abundance	ns		<i>NirK</i> abundance	ns		
<b>Site x <i>NirK</i> abundance</b>	<.001	<b>5.43</b>	Moisture x site	ns		<b>SOC x site</b>	<.001	<b>6.50</b>	<b>6.50</b>
			<b>SOC x site</b>	<.001	<b>7.01</b>	Moisture x site	ns		
<b>Total explained</b>		<b>87.28</b>	<b>Total explained</b>		<b>81.83</b>	<b>Total explained</b>		<b>88.33</b>	<b>88.33</b>

higher in the surface than upper soil layers), whereas denitrification potential was similar in both soil layers in crops systems, as a consequence of frequent mixing of soil by tillage.

After changes in land-use and tillage practices, the same pattern of response of the denitrification potential was observed whatever the site considered. Indeed for both conversion from grasslands to annual crop system and from no-tilled to tilled soils, denitrification potential was quickly and intensely modified, decreasing fastly to levels observed for tilled soils. This sudden decrease was likely due to the tillage-induced mixing of the surface soil layer with the upper layer, the latter being characterised by lower denitrification potentials. Conversely, the cessation of this soil physical disturbance as in the case of conversion from crops to grasslands and from tilled to no-tilled systems did not affect denitrification potential, even after 18 months at Boigneville site and 3 years at Lusignan site. This shows that application of tillage on previous no-tilled crops or grasslands immediately affect the denitrification potential and suppress its vertical distribution in soil, whereas the effects on denitrification potential, of cessation of tillage on previous tilled crops would require several years to be detected. Such a similar response of denitrification potential to different land-use changes is striking, since the 2 sites differed for many factors such as soil characteristics, climate, management and vegetation. This highlights that the soil physical disturbance leading to soil homogeneization in the upper 20 to 30 cm of soil was the major determinant of denitrification potential response to changes in land-use.

### ***Importance of denitrifiers abundance and community structure to understand changes in denitrification potential***

Changes in denitrification potential could result from (1) changes in the physiological activity of individual cells (i.e., mean activity per cell), (2) changes in the community size (cell number), and/or (3) changes in the community composition. Indeed, denitrification is an inducible activity (synthesis of key enzymes in presence of nitrate and anaerobiosis conditions) (Zumft 1997), so that the size and activity of each functional group are not necessarily tightly coupled. In addition, different denitrifiers strains can generate different levels of denitrification, so that community composition can also influence community activity.

### ***Changes in denitrification potential as regards to changes in community structure***

Comparing soils of both control treatments for each site (grassland vs. rotation of annual crops; no-tilled vs. tilled soils), we observed significant differences in the genetic



structures of the denitrifying community, concurrently to differences in denitrification potential. This result is consistent with previous studies reporting concurrent changes in the structure and activity of the denitrifying community between meadow and forest soils (Boyle et al. 2006; Rich et al. 2003). Furthermore, we observed on both sites that genetic structures were significantly affected after changes in land-use and tillage practices. However, denitrification potential was only weakly and sometimes even not correlated to genetic structures. This uncoupling between changes in community structure and activity is consistent with other studies who reported changes in denitrification activity associated with minor changes in the denitrifier community after disturbances such as mucilage or fertilizers amendments respectively (Enwall et al. 2005; Mounier et al. 2004), sheep grazing regime (Patra et al. 2006) and soil transfer between meadow and forest systems (Boyle et al. 2006). Similarly, differences in N<sub>2</sub>O emissions from soil between different land-uses were not or only marginally linked with the changes in the denitrifying community using *nosZ* as the target gene (Ma et al. 2008). This uncoupling could be explained by the functional redundancy of the community (different populations able to realize the function in a similar way) as strongly suggested by (Wertz et al. 2006; Wertz et al. 2007). It was also possible that the majority of the populations detected were not active and did not or marginally participate to the denitrification potential. This hypothesis could be tested targeting active populations with other approaches such as those based on RNA. This uncoupling between changes in denitrification potential and denitrifier community structure show that other key factors have to be accounted for to explain the observed changes in denitrification potential.

#### *Changes in denitrification potential as regards to changes in abundance*

Denitrifier abundance, in the surface layer, was 1.5 to 3-fold higher in the soil covered with grass as compared to arable crop soil (Lusignan), and in no-till soil as compared to tilled soil (Boigneville). Conversion from grassland to crop systems and from no-tilled to tilled systems led to a rapid decrease in the denitrifier abundance, at levels similar to those in control crop and tilled systems. At the contrary, conversion from crop to grassland system and from tilled to no-tilled systems led to a weak or not significant changes in the denitrifier abundance for both sites. Such a similar pattern of response to changes in land-use was also observed for the microbial biomass, suggesting that variations of the denitrifiers abundance followed the same tendency as microbial heterotroph community. The good correlation between microbial biomass and denitrifiers abundance demonstrated that a part of the



heterotroph microbial community was involved in the denitrification process and so, in the explanation of the response of the denitrification potential after changes in land-use.

When denitrifier abundance was fitted as the first explanatory term in the GLM analysis, it explained 51% and 29% of the variance of denitrification potential for Lusignan and Boigneville sites, respectively. However, in this case, soil organic carbon, moisture and nitrate still explained a large part of the residual variance in denitrification potential. In contrast, when soil organic carbon, moisture and nitrate were fitted first, the effect of denitrifier abundance on denitrification potential was not significant anymore. This result indicated that the denitrifier abundance effect on denitrification potential was partially the result of the effect of soil organic carbon.

### ***Importance of environmental factors to understand changes in denitrification potential***

Denitrification is an inducible activity which requires given environmental conditions to occur : anaerobic conditions, availability of nitrate as an electron acceptor and availability of organic carbon as an energy source (Tiedje 1988). Therefore, moisture that influences O<sub>2</sub> availability, in soil and nitrate and organic carbon pools can all be important drivers explaining the observed changes in denitrification potential.

The variations of denitrification potential were not or weakly (less than 20%) explained by soil nitrate content at Lusignan and Boigneville sites, respectively. This lack of relation was consistent with results of other studies (Hojberg et al. 1996; Oehler et al. 2007) and notably with that of Barnard et al. (2006) where nitrate pool could explain only 10% of the variation in denitrification potential in grassland systems submitted to global changes components. This is not surprising as soil nitrate content of a soil layer a given day, is the consequence of different biological and physical processes (nitrate production and consumption processes including crop uptake, nitrate transport in soil with water), that have their own time scale response, and therefore the punctual measurement of this pool cannot reflect N availability to denitrifiers. Conversely, the flux of gross N mineralization could be a better estimate of N mineral availability for micro-organisms (Hart et al. 1997). Higher values were observed at Lusignan (between 1 and 4 mg N.kg<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup>, 5ème chapitre de la thèse) than at Boigneville site (between 0.2 and 1 mg N.kg<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup>, (Attard et al. submitted). This could be due to a weaker N availability at Boigneville, resulting in a higher importance of the variations of N content in the determination of denitrification potential at Boigneville than at Lusignan site.





Moisture influenced the denitrification potential, explaining a significant part of the variation in denitrification potential (32% and 58% when fitted as the first explanatory term in the GLM analysis for Lusignan and Boigneville sites, respectively). This effect of moisture on denitrification potential was retrieved in a previous study, but as the main driver of denitrification in grasslands systems submitted to global changes components (Barnard et al. 2006).

In our study, the main explanatory term of variations in denitrification potential was the soil organic carbon that explained 76% and 53% of the variations in denitrification potential for Lusignan and Boigneville, respectively. We have also tested the effects of DOC and MBC on denitrification potential, but the observed relationships were weaker than for TOC probably because these C pools are very labile, and then more subject to variations in environmental conditions than TOC. We can hypothesize that soil organic carbon influenced denitrification potential not only directly but also indirectly through moisture and denitrifiers abundance effects. On the one hand, higher soil organic carbon content enhances soil water holding capacity, and can then promote the anaerobic conditions required for denitrification. On the other hand, increase in soil organic carbon promotes the growth of denitrifiers as heterotrophs which can result in an increased denitrification potential. In a similar way, Kandeler et al. (2006) have reported evidence that organic carbon was the most important factor that explains denitrifiers abundance. Our results from our GLM analysis clearly show that soil organic carbon still has a direct effect on denitrification potential even when considering first its indirect effects via changes in denitrifier abundance and soil moisture. In contrast, when assuming that soil organic carbon was the main factor directly influencing denitrification potential, the remaining influence of moisture and nitrate was marginal and the influence of denitrifier abundance was not significant. Although perfectly unravelling the effects of abundance, soil organic carbon, moisture and nitrate is difficult, the results of the GLM offer a hierarchisation of the influences of these different factors on denitrification potential. The major determinant of denitrification potential was soil organic carbon, through both an indirect influence on denitrifier abundance and a direct influence on specific activity (change in activity at a given abundance level). Moisture had a significant although weaker influence, and nitrate effect was particularly weak. This hierarchy of factors is consistent with the qualitative assessment of environmental determinants of denitrification in soil proposed by Tiedje (1988). However, to our knowledge, it is the first time that a study qualitatively addresses this issue of hierarchisation of environmental factors and denitrifier abundance on denitrification. It is also important to note that our conclusions hold for 2 different sites that



differ in term of their soil characteristics, climate and management. For instance, tillage of grassland to establish a crop will bury more fresh organic matter than tillage of crops previously untilled. Combining our results obtained on the 2 sites, our conclusion thus goes beyond any site effect and denitrification response to land-use is strongly linked to changes in soil organic carbon and to a lesser extent, changes in moisture. This result, highlighting the strong coupling that exists between carbon and nitrogen cycles, is important to evaluate innovative, environmental-friendly practices and management of agroecosystems. In particular, some practices such as no-tillage are sometimes considered as environmental-friendly because they might enhance carbon sequestration (this is still controversial) and might favor biodiversity (mainly soil biodiversity by increase in organic substrate amount in soil if no-tillage is not associated to higher pesticides input, and is maintained for a long enough period). Our results however show that increased soil organic carbon in the upper soil layer will markedly enhance denitrification potential and likely N<sub>2</sub>O emissions (particularly in soils subjected to high water regime) which could mitigate the expected positive effect of these practices on the environment.

**Appendix 1 :** Results (*p* values) of the one-way ANOSIM for comparisons of the denitrifying community structure in the upper soil layer between each pair of treatments for each sampling date for Lusignan and Boigneville sites. For Lusignan site, GG: grassland control, GC conversion from grassland to crop, CC crop control, CG conversion from crop to grassland. For Boigneville site, NN: no-tillage control, NT: application of tillage on previously untilled soils, TT: tillage control, TN: cessation of tillage on previously tilled soils. NS: not significant at the *p* level 0.06.

Lusignan site				
Time after change in land-use				
	0	3.5	12	24
GG-CC	0.029	0.029	0.029	0.029
GC-GG	ns	0.029	0.029	0.029
CG-GG	0.029	0.029	0.029	0.029
GC-CC	0.029	0.029	0.029	0.029
CG-CC	ns	0.057	0.029	ns

Boigneville site					
Time after change in tillage practices					
	0	0.5	3.5	12	17
NN-TT	0.029	0.029	0.029	0.029	0.057
NT-NN	ns	0.029	0.029	0.029	ns
TN-NN	0.029	0.029	ns	ns	ns
NT-TT	0.029	0.029	ns	ns	0.029
TN-TT	ns	0.029	0.029	0.029	ns

- Attard E, Poly F, Laurent F, Commeaux C, Recous S, Le Roux X (submitted) Response of Nitrobacter-like nitrite oxidizers to changes in tillage practices: importance for changes in nitrite oxidation activity.
- Baggs EM, Stevenson M, Pihlatie M, Regar A, Cook H, Cadisch G (2003) Nitrous oxide emissions following application of residues and fertiliser under zero and conventional tillage. *Plant and Soil* **254**:361-370.
- Balesdent J, Chenu C, Balabane M (2000) Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage. *Soil and Tillage Research* **53**:215-230.
- Barnard R et al. (2006) Several components of global change alter nitrifying and denitrifying activities in an annual grassland. *Functional Ecology* **20**:557-564.
- Bijay S, Ryden JC, Whitehead DC (1989) Denitrification potential and actual rates of denitrification in soils under long-term grassland and arable cropping. *Soil Biology and Biochemistry* **21**:897-901.
- Boyle SA, Rich JJ, Bottomley PJ, Cromack K, Myrold DD (2006) Reciprocal transfer effects on denitrifying community composition and activity at forest and meadow sites in the Cascade Mountains of Oregon. *Soil Biology & Biochemistry* **38**:870-878.
- Cavigelli MA, Robertson GP (2000) The functional significance of denitrifier community composition in a terrestrial ecosystem. *Ecology* **81**:1402-1414.
- Clarke KR, Ainsworth M (1993) A Method of Linking Multivariate Community Structure to Environmental Variables. *Marine Ecology-Progress Series* **92**:205-219.
- Dobbie KE, Smith KA (2003) Nitrous oxide emission factors for agricultural soils in Great Britain: the impact of soil water-filled pore space and other controlling variables. *Global Change Biology* **9**:204-218.
- Enwall K, Philippot L, Hallin S (2005) Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:8335-8343.
- FAO-UNESCO (1987) *Soils of the world, Food and Agriculture Organization and United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization*. Elsevier Science Publishing Co. Inc  
New York
- Hart SC, Binkley D, Perry DA (1997) Influence of red alder on soil nitrogen transformations in two conifer forests of contrasting productivity. *Soil Biology and Biochemistry* **29**:1111-1123.



- Henry S, Baudoin E, Lopez-Gutierrez JC, Martin-Laurent F, Baumann A, Philippot L (2004) Quantification of denitrifying bacteria in soils by nirK gene targeted real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* **59**:327-335.
- Hojberg O, Binnerup SJ, Sorensen J (1996) Potential rates of ammonium oxidation, nitrite oxidation, nitrate reduction and denitrification in the young barley rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* **28**:47-54.
- Holland JM (2004) The environmental consequences of adopting conservation tillage in Europe: reviewing the evidence. *Agriculture Ecosystems & Environment* **103**:1-25.
- Kamphake LJ, Hannah SA, Cohen JM (1967) Automated Analysis for Nitrate by Hydrazine Reduction. *Water Research* **1**:205-&.
- Kandeler E, Deiglmayr K, Tschirko D, Bru D, Philippot L (2006) Abundance of narG, nirS, nirK, and nosZ genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:5957-5962.
- Krom MD (1980) Spectrophotometric Determination of Ammonia - a Study of a Modified Berthelot Reaction Using Salicylate and Dichloroisocyanurate. *Analyst* **105**:305-316.
- Lensi R, Claysjoserand A, Monrozier LJ (1995) Denitrifiers and Denitrifying Activity in Size Fractions of a Mollisol under Permanent Pasture and Continuous Cultivation. *Soil Biology & Biochemistry* **27**:61-69.
- Liu X, Mosier A, Halvorson A, Zhang F (2006) The Impact of Nitrogen Placement and Tillage on NO, N<sub>2</sub>O, CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> Fluxes from a Clay Loam Soil. *Plant and Soil* **280**:177-188.
- Liu XD et al. (2003) Molecular diversity of denitrifying genes in continental margin sediments within the oxygen-deficient zone off the Pacific coast of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* **69**:3549-3560.
- Liu XJJ, Mosier AR, Halvorson AD, Reule CA, Zhang FS (2007) Dinitrogen and N<sub>2</sub>O emissions in arable soils: Effect of tillage, N source and soil moisture. *Soil Biology & Biochemistry* **39**:2362-2370.
- Ma WK, Bedard-Haughn A, Siciliano SD, Farrell RE (2008) Relationship between nitrifier and denitrifier community composition and abundance in predicting nitrous oxide emissions from ephemeral wetland soils. *Soil Biology & Biochemistry* **40**:1114-1123.
- Mounier E et al. (2004) Influence of maize mucilage on the diversity and activity of the denitrifying community. *Environmental Microbiology* **6**:301-312.
- Oehler F, Bordenave P, Durand P (2007) Variations of denitrification in a farming catchment area. *Agriculture Ecosystems & Environment* **120**:313-324.





- Oorts K, Merckx R, Grehan E, Labreuche J, Nicolardot B (2007) Determinants of annual fluxes of CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O in long-term no-tillage and conventional tillage systems in northern France. *Soil & Tillage Research* **95**:133-148.
- Pankhurst CE, Kirkby CA, Hawke BG, Harch BD (2002) Impact of a change in tillage and crop residue management practice on soil chemical and microbiological properties in a cereal-producing red duplex soil in NSW, Australia. *Biology and Fertility of Soils* **35**:189-196.
- Patra AK et al. (2006) Effects of management regime and plant species on the enzyme activity and genetic structure of N-fixing, denitrifying and nitrifying bacterial communities in grassland soils. *Environmental Microbiology* **8**:1005-1016.
- Patra AK et al. (2005) Effects of grazing on microbial functional groups involved in soil N dynamics. *Ecological Monographs* **75**:65-80.
- Petersen SO, Schjonning P, Thomsen IK, Christensen BT (2008) Nitrous oxide evolution from structurally intact soil as influenced by tillage and soil water content. *Soil Biology & Biochemistry* **40**:967-977.
- Philippot L, Hallin S, Schloter M (2007) *Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil*. In: *Advances in Agronomy, Vol 96*, vol 96, pp 249-305.
- Rich JJ, Heichen RS, Bottomley PJ, Cromack K, Myrold DD (2003) Community composition and functioning of denitrifying bacteria from adjacent meadow and forest soils. *Applied and Environmental Microbiology* **69**:5974-5982.
- Sala OE et al. (2000) Biodiversity - Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* **287**:1770-1774.
- Six J, Ogle SM, Breidt FJ, Conant RT, Mosier AR, Paustian K (2004) The potential to mitigate global warming with no-tillage management is only realized when practised in the long term. *Global Change Biology* **10**:155-160.
- Tiedje JM (1988) Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In: B ZAJ (ed) *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley and Sons, New York, N. Y.
- USDA (2001) Conservation tillage firmly planted in US agriculture. In:
- van Bochove E, Prevost D, Pelletier F (2000) Effects of freeze-thaw and soil structure on nitrous oxide produced in a clay soil. *Soil Science Society of America Journal* **64**:1638-1643.
- Vance ED, Brookes PC, Jenkinson DS (1987) An Extraction Method for Measuring Soil Microbial Biomass-C. *Soil Biology & Biochemistry* **19**:703-707.



- Wang XB, Cai DX, Hoogmoed WB, Oenema O, Perdok UD (2007) Developments in conservation tillage in rainfed regions of North China. *Soil & Tillage Research* **93**:239-250.
- Wertz S et al. (2006) Maintenance of soil functioning following erosion of microbial diversity. *Environmental Microbiology* **8**:2162-2169.
- Wertz S et al. (2007) Decline of soil microbial diversity does not influence the resistance and resilience of key soil microbial functional groups following a model disturbance. *Environmental Microbiology* **9**:2211-2219.
- Zumft WG (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**:533-+.



## **Chapitre 5**

**Dynamique de l'azote et du carbone dans un sol sous culture et sous prairie, et effets à court terme du changement de mode d'occupation**



---

## **Chapitre 5 : Dynamique de l'azote et du carbone dans un sol sous culture et sous prairie, et effets à court terme du changement de mode d'occupation.**

---

### **Introduction**

En raison de problèmes environnementaux ou de décisions socio-économiques, les sols agricoles subissent fréquemment des modifications de leurs modes d'occupation (forêt, prairie, cultures annuelles...) et de gestion (amendement organique et/ou fertilisation azotée, travail du sol, cultures intermédiaires...). Parmi ces changements de gestion, le retournement de prairies après une durée d'exploitation en pâturage ou en fauchage de 3 ans à 5 ans est très pratiqué par les agriculteurs d'exploitations conduites en polyculture-élevage. De manière complémentaire, des prairies sont réintroduites dans les cycles de cultures pour prévenir les risques de pollution nitrique des eaux douces liée à l'intensification de l'agriculture et/ou dans le but de favoriser le stockage du carbone dans les sols.

Ces changements de gestion peuvent alors engendrer des modifications (i) des propriétés physico-chimiques du sol par la nature et la localisation de la matière organique, l'agrégation, le potentiel hydrique et (ii) des propriétés biologiques du sol par la localisation, les activités, les effectifs et la composition des microorganismes du sol. Ces modifications peuvent s'accompagner d'évolution des stocks de carbone et d'azote et des flux associés.

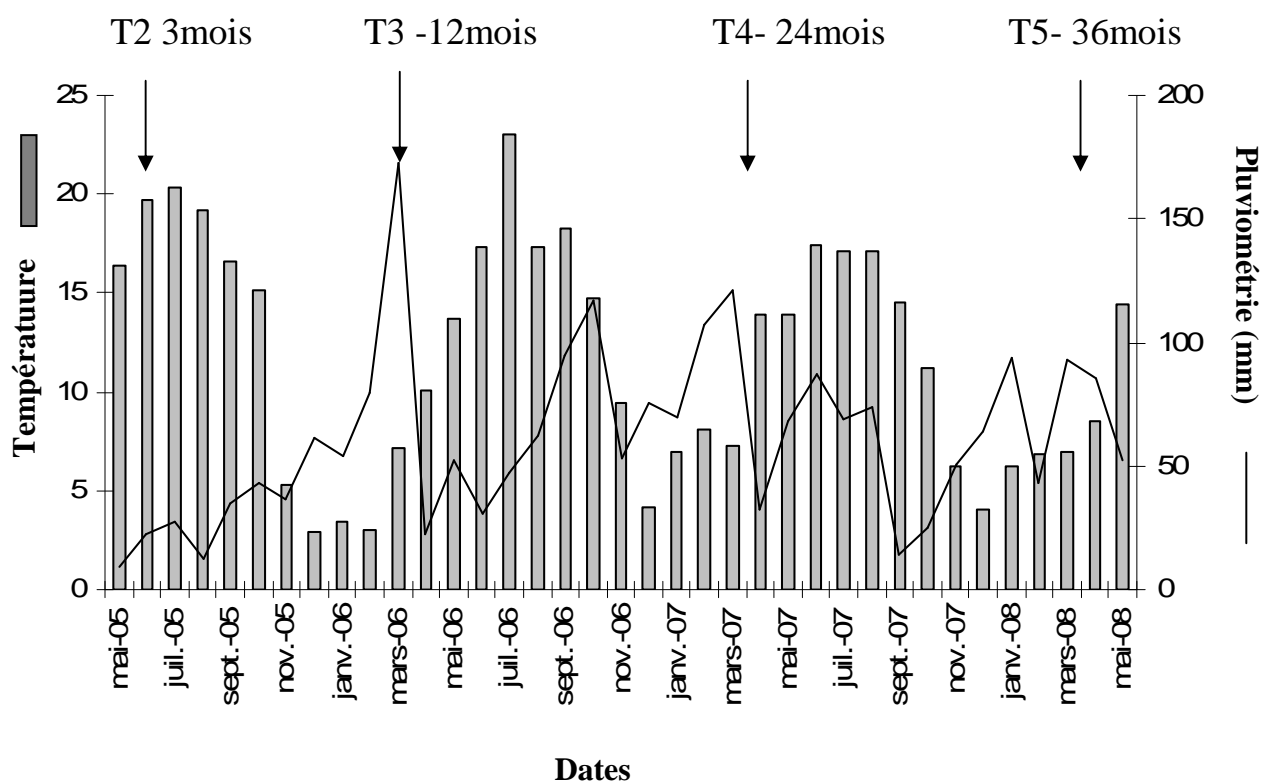
Dans la littérature de nombreuses études ont comparé le fonctionnement des prairies avec celui des cultures via des mesures portant sur les compartiments organiques (ou des fractions chimiques ou physiques de ces compartiments) et les flux. L'article de revue de Booth et al. (2005) synthétise d'ailleurs les études ayant porté sur la caractérisation des flux bruts d'azote en prairie et en culture. On peut y noter qu'en moyenne les prairies présentent des concentrations en azote minéral et des flux bruts de minéralisation et d'organisation largement supérieurs aux mesures effectuées dans les sols de culture.

Notre étude se distingue des précédents travaux au travers de 2 principales originalités : tout d'abord nous n'avons pas mené cette étude dans le seul objectif de comparer les systèmes prairiaux et cultivés mais dans celui d'analyser la cinétique d'évolution des activités microbiennes après changements de l'occupation des sols: implantation d'une prairie sur des sols initialement en cultures et retournement d'une prairie pour installer une culture. Deuxièmement nous avons l'objectif d'associer l'étude des flux d'azote (minéralisation, organisation et de nitrification), leurs relations avec les compartiments carbonés (carbone



**Tableau 1 : Quantités de biomasse végétale, d'azote et de carbone incorporés au moment de la destruction de la prairie.** La biomasse racinaire est estimée sur la couche 0-30 cm et la couche 30-60cm, la couche 0-30cm représentant 90% de la masse totale mesurée.

	M.S. (kg/ha)	% N	N total (kg/ha)	% C	C total (kg/ha)	C/N
Biomasse aérienne	2145	2.33	50	43.6	935	19
Biomasse racinaire	4625	1.05	49	33.2	1535	32



**Fig. 1 :** Cinétiques des moyennes mensuelles de température et de pluviométrie. Les flèches indiquent les dates de prélèvements de sol.

organique total, carbone dissous), l'activité microbienne hétérotrophe, et l'activité dénitrifiante. Cette dernière activité a été présentée dans le chapitre précédent.

## **1. Matériel et Méthodes**

### **1.1. Site d'étude**

Le site est situé à Lusignan (Poitou-Charentes, France, longitude : 00° 07' 10" ; latitude : 46° 25' 03" ; altitude : 135m) sur la station expérimentale de l'INRA. Le climat est de type océanique à sécheresse estivale marquée (Température moyenne annuelle de 12°C et des précipitations de l'ordre 700 mm/an Fig. 1). Le sol est de type Brunisol saturé profond développé sur argile rubéfié. Le sol est de type 'terre rouge à châtaignier' composé de 18% d'argile, 60% de limon et de 17% de sable. Le pH est de 6,8. Les teneurs de C total et N total du sol sont respectivement de 13,2 g/kg et 1,4 g/kg dans l'horizon 0-30cm.

Nous avons travaillé sur 8 parcelles (70 x 50m) continuellement cultivées depuis au moins 5 ans dans une rotation maïs-blé-orge (C) et 8 parcelles (20m x 12m) sous prairie sans labour depuis 5 ans (P). Cette prairie temporaire est représentative du système polyculture élevage. C'est une prairie qui a été semée en Ray-Grass anglais, sur un sol utilisé antérieurement en culture. Cette prairie a été conduite en fauche durant ces 5 années d'exploitation. La biomasse aérienne et la biomasse souterraine de cette prairie ont été déterminées initialement, au démarrage de l'expérimentation (Mémoire de C. Léonard, 2006). Les mesures des biomasses aériennes et racinaires ont été répétées 3 fois par parcelle. Le retournement de la prairie a entraîné une incorporation de 735 kg C ha<sup>-1</sup> par la biomasse aérienne et de 1745 kg C ha<sup>-1</sup> par la biomasse racinaire. Au retournement de prairie, on incorpore donc environ 100 kg N ha<sup>-1</sup> sous forme de biomasse végétale "fraîche" dont 50 kg N ha<sup>-1</sup> par la biomasse aérienne ayant un rapport C/N de 19 et 50 kg N.ha<sup>-1</sup> par la biomasse racinaire ayant un rapport C/N de 32 (Tableau 1).

### **1.2 Traitements expérimentaux**

A la mi-mars 2005, la moitié des parcelles (4 parcelles en culture et 4 parcelles en prairie) a subi un changement de mode de gestion: la moitié des parcelles précédemment en culture a été convertie en culture en semant un mélange de fétuque, dactyle et ray-grass (CP). La moitié des parcelles précédemment en prairie a été labourée afin d'y installer une culture



de maïs (PC). Ce dispositif a donc permis d'obtenir 4 traitements : une rotation culturale continue (CC), une prairie permanente (PP), une conversion de rotation de cultures annuelles en prairie temporaire (CP) et une conversion de prairie temporaire en rotation de cultures annuelles (PC). La rotation annuelle des cultures a été maïs-blé-orge. Ces cultures ont reçu un apport raisonné de fertilisants et de pesticides. Pour les traitements CC et PC, les semis des cultures ont été réalisés fin avril 2005 (maïs), fin octobre 2005 (blé), fin octobre 2006 (orge). Les labours ont été réalisés en octobre 2005, octobre 2006, respectivement 8 et 18 mois après le début de l'expérimentation.

### 1.3. Prélèvement de sols

Les sols ont été prélevés juste avant les changements de gestion en mars 2005 (t<sub>0</sub>), puis 3, 12, 24 et 36 mois après le t<sub>0</sub> pour tous les traitements, avec un point supplémentaire à +3 semaines après le t<sub>0</sub> pour les traitements ayant subi les changements, PP et PC. Pour chaque date, 10 carottes de sol ont été prélevées aléatoirement pour chaque parcelle dans l'horizon 0-10cm. Pour chaque parcelle, les carottes de sol ont été mélangées puis tamisées à 2mm. A 24 et 36 mois, l'horizon 10-30cm a également été prélevé selon le même protocole. Cependant, en raison du délai de traitement des échantillons, les résultats du prélèvement à 36 mois ne peuvent être présentés dans ce chapitre. Le sol a ensuite été stocké quelques jours à 4°C avant de réaliser les mesures de flux bruts d'azote et les analyses de C et N. Sur les mêmes échantillons ont été réalisées les mesures d'effectifs, diversité et activité potentielle des dénitrifiants (voir chapitre 3).

### 1.4. Détermination des flux bruts d'azote par la technique <sup>15</sup>N

Les mesures de flux bruts sont basées sur le principe de dilution/enrichissement isotopique avec l'isotope <sup>15</sup>N (Murphy et al., 2003) qui permet d'accéder simultanément à l'estimation de la minéralisation de l'azote (ammonification), de la nitrification et de l'organisation (assimilation de l'azote minéral par les hétérotrophes). Pour chaque date de prélèvement et chaque traitement, un sous échantillon de sol frais (60g équivalent sol sec) a été ajusté (par dessiccation contrôlée à la température ambiante, ou par humectation) à 19 % d'humidité. Le sol a été étalé en une fine couche et vaporisé avec une solution de <sup>15</sup>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (15 µg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N g sol<sup>-1</sup> enrichi à 5 % <sup>15</sup>N). Le sol a ensuite été minutieusement mélangé avec cette solution, puis séparé en 2 sous échantillons placés chacun dans des cristallisoirs et incubés à 15°C. L'un des échantillons a été extrait après 2h d'incubation, l'autre échantillon après 26h d'incubation. Les calculs de dilution et enrichissement isotopiques des



compartiments ont été effectués sur les mesures effectives des compartiments d'azote minéral et organique des temps 2h et 26h.

Le sol de chaque échantillon a été mélangé (30 tours  $\text{min}^{-1}$ ) avec 100mL de KCl 1M pendant 30minutes. Après centrifugation (15min; 3500 tours  $\text{min}^{-1}$ ), les surnageants ont été filtrés (Durieux No.3) pour obtenir la solution de sol sur laquelle a été dosé l'azote minéral. Le culot a été remis en suspension avec 50mL de KCl 1M et mélangé (30 tours. $\text{min}^{-1}$ ) pendant 15minutes. Après centrifugation (15min; 3500 tours  $\text{min}^{-1}$ ), les surnageants ont été éliminés et le culot récupéré pour subir 2 nouvelles étapes de lavage avec le KCl, nécessaires à l'élimination de l'azote minéral enrichi en  $^{15}\text{N}$ . A l'issue de ces étapes, le culot final a été séché pendant 24 h à  $105^\circ\text{C}$ , finement broyé et conservé en vue de l'analyse élémentaire et isotopique.

La technique de micro diffusion (Brooks et al., 1989) a été utilisée pour mesurer l'abondance en  $^{15}\text{N}$  du  $\text{NH}_4^+$  et  $\text{NO}_3^-$  par spectrométrie de masse couplé à un analyseur élémentaire CHN (N analyser Euro EA, Eurovector et Delta Advantage, Thermo-Electron, Bremen, Deutschland). Les concentrations en azote minéral ont été obtenues par colorimétrie en flux continu (TRAACS 2000) comme décrit par Kamphake et al. (1967) pour le  $\text{NO}_3^-$  et par Krom (1980) pour le  $\text{NH}_4^+$ .

Les mesures de flux bruts ont été obtenues grâce au modèle de calcul *Fluaz* (Mary et al., 1998) qui permet de calculer simultanément les flux de minéralisation, organisation et nitrification. Ce modèle numérique calcule les flux d'azote, à partir des mesures de variations d'azote ammoniacal, azote nitrique et azote organique et l'enrichissement isotopique  $^{15}\text{N}$  de ces compartiments aux temps  $t_0$  et  $t_1$  de mesures des flux bruts, en optimisant la valeur de ces paramètres par rapport à celles mesurées, par la méthode des moindres carrés. Nous n'avons pas réalisé de répétitions au laboratoire, en raison du nombre d'échantillons et de la lourdeur des expérimentations et analyses. Les valeurs représentent donc directement les moyennes des 4 blocs représentant les répétitions au champ par traitement.

### 1.5. Dosages du Carbone Organique Total, du Carbone Organique Dissous, de la Biomasse Microbienne et du C-CO<sub>2</sub> respiré

Le carbone organique total (du culot de sol sec obtenu après les lavages successifs de sol au KCl) a été dosé par combustion sèche avec l'analyseur élémentaire CHN.

La respiration a été mesurée au cours de l'incubation des échantillons de sol utilisés pour les flux bruts d'azote. A cette fin un bécher contenant de la soude (0.25 M) a été placé dans chaque bocal hermétique. Au moment de l'arrêt de l'incubation, le CO<sub>2</sub> piégé dans la



solution de NaOH a été précipité avec une solution de 0.1M BaCl<sub>2</sub> et titré en retour par HCl 0.25 M.

Le carbone de la biomasse microbienne (BMC) a été déterminé par la méthode de fumigation extraction proposée par Vance et al. (1987), modifiée par Chaussod et al. (1988). L'extraction du carbone soluble des échantillons de sol, fumigés et non fumigés avec le chloroforme, a été réalisée avec 40 mL de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.03M (rapport sol-solution 1:4, agitation de 30 min à 20°), et a été suivie d'une séparation des extraits par centrifugation (20 min, 5800 g) et stockage des extraits à -18°C. La concentration en C soluble des extraits a été mesurée par un auto-analyseur (1010, O.I. analytical) basé sur l'oxydation à 100°C au persulfate, le CO<sub>2</sub> produit étant mesuré par spectrométrie infrarouge (Barcelona, 1984). Le C de la biomasse microbienne a été calculé par différence entre les teneurs en C soluble des sous échantillons fumigés et non fumigés de chaque échantillon de sol, en utilisant le facteur de correction K<sub>EC</sub>=0.38 (Vance et al., 1987) .

Par convention dans ce travail, le carbone organique dissous (COD) des sols présenté, est celui mesuré dans les sous échantillons non fumigés.

#### 1.6. Expérience associée : mesure des flux nets de C et N après retournement de la prairie

En parallèle de notre travail, une expérience associée a été dédiée spécifiquement aux effets sur le court terme (2 mois, du 17 mars au 17 mai 2005) du retournement de prairie sur les flux nets de carbone et d'azote. Cette expérience faisait l'objet du stage de Master Recherche de C. Léonard en 2006. Ces résultats étant importants pour l'interprétation de nos données, les protocoles et résultats essentiels seront rappelés dans ce chapitre, ceux-ci n'étant pas accessibles pour l'instant (résultats non publiés, exceptés dans le mémoire de Master).

#### Cinétiques des émissions de CO<sub>2</sub> :

Les mesures de quantité de carbone minéralisé (CO<sub>2</sub>) ont été effectuées sur sol nu après retournement de prairie (traitement PC), non semées avec du maïs à ce moment-là. Ces mesures ne sont pas effectuées sur prairie car elles demanderaient de tenir compte de la respiration et de la photosynthèse du couvert prairial, donc un dispositif supplémentaire. Un jeu de 4 enceintes automatiques et un analyseur a été installé sur une parcelle de prairie labourée. Pour pouvoir faire des comparaisons, un jeu identique a été installé sur un sol nu de culture n'ayant pas reçu de matière fraîche, sur une parcelle de la rotation de grande culture (CC). La végétation se développant à l'intérieur des enceintes a été systématiquement enlevée.





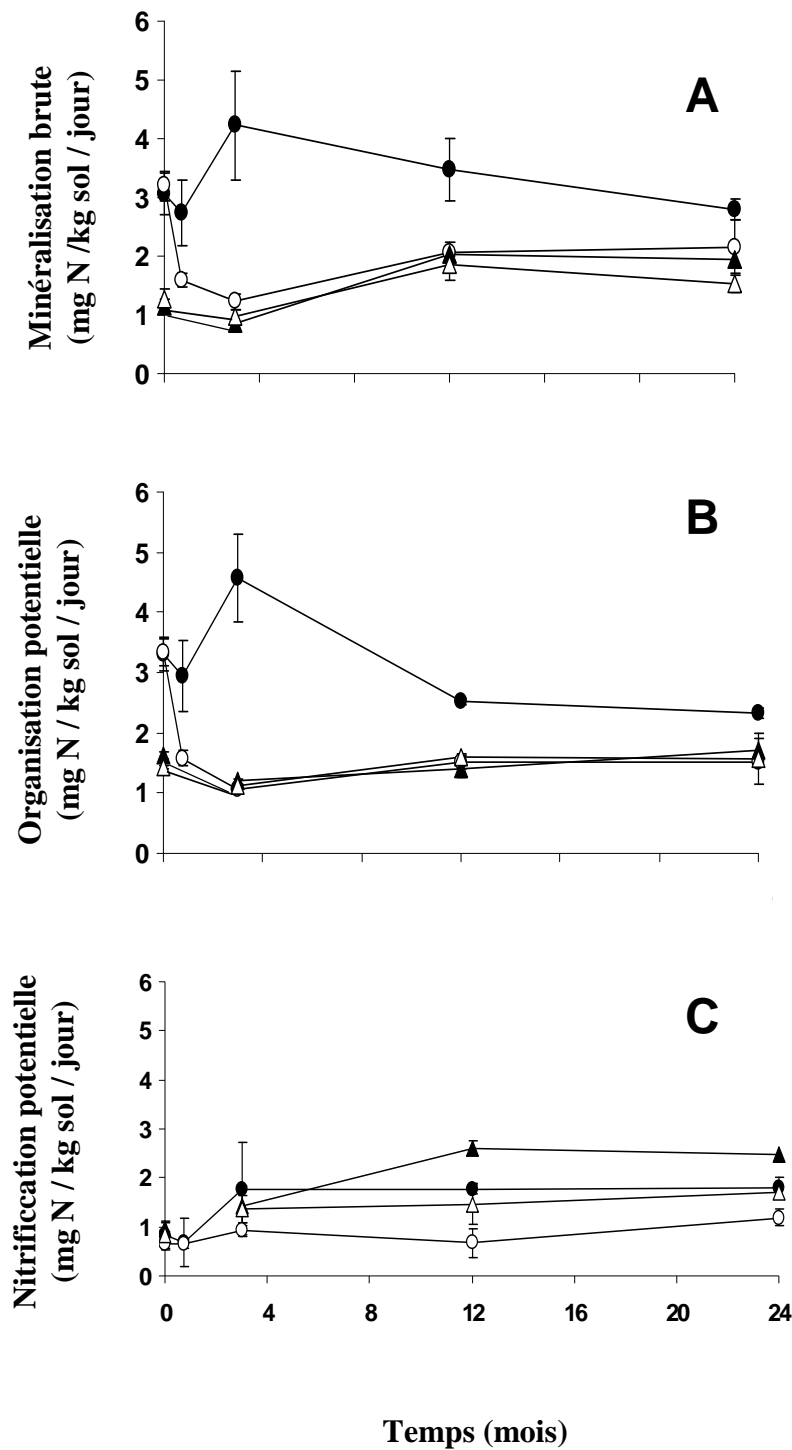
Les quantités nettes de carbone minéralisé ont été mesurées par le dégagement de CO<sub>2</sub>. Le flux de CO<sub>2</sub> a été mesuré 4 fois par jour, toutes les 6 heures (4h, 10h, 16h, 22h T.U.). Des enceintes automatiques se ferment hermétiquement pendant 5 minutes et envoient l'air contenu dans l'enceinte vers un analyseur de CO<sub>2</sub>. Les mesures de flux ont été enregistrées dans un boîtier Campbell permettant de conserver les données et de ne les collecter que 2 fois par semaine. Les flux de CO<sub>2</sub> mesurés ont été normalisés à l'aide d'un calcul de temps normalisé prenant en compte les variations de température et humidité. Cette méthode permet de comparer, en conditions fluctuantes de température et d'humidité, des processus dépendant des activités microbiennes du sol tels que ceux affectant les cycles du carbone dans le sol (Recous et al., 1999). La normalisation s'est faite avec une température de référence de 10°C et une humidité à la capacité au champ. Cette normalisation n'a pas été faite à la température à laquelle sont exprimés les flux d'azote dans ce travail. Ceci devra être homogénéisé pour une interprétation complète et présentation ultérieure conjointe des deux approches.

#### Minéralisation nette d'azote

Les mesures d'azote minéral dans les parcelles PP et PC ont été réalisées sur les 4 blocs et sur 3 horizons (0-30 cm ; 30-60 cm et 60-90 cm). Ceci a été réalisé en prélevant 5 carottes par horizon, les 5 carottes ont été mélangées afin d'obtenir un seul prélèvement par horizon et par parcelle. Ces prélèvements ont été effectués à une fréquence d'environ 1 fois par semaine. La mesure de la teneur en azote ammoniacal et nitrique des échantillons de sol a été réalisée comme décrit au paragraphe 1.4.

#### 1.7. Tests statistiques

Une analyse de variance à un facteur a été réalisée afin de déterminer les effets des changements de mode de gestion sur le COT, COD et la biomasse microbienne. Un test de Fischer a été utilisé pour déterminer le degré de significativité des effets des changements de mode de gestion entre les différents traitements pour chaque date.



**Fig. 2** : Cinétiques des flux d'azote dans l'horizon 0-10cm : (A) Flux brut de minéralisation, (B) Flux potentiel d'organisation, (C) Flux potentiel de Nitrification. ●: Prairies contrôles (PP); ○: Retournement de prairies (PC); ▲: Cultures contrôles (CC); △: Implantation de prairies (CP). Les vitesses sont exprimées par jour à 15°C et potentiel hydrique de -80 kPa. Les barres d'erreur correspondent aux coefficients de variations donnés par le modèle Fluaz.

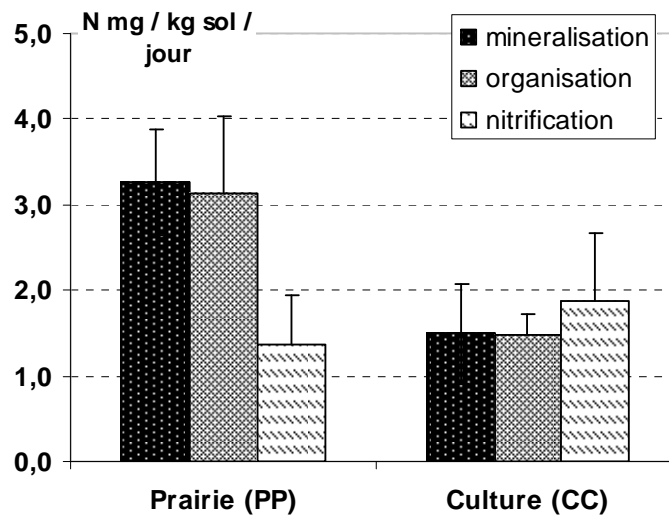
## **2. Résultats**

### **2.1. Flux bruts d'azote**

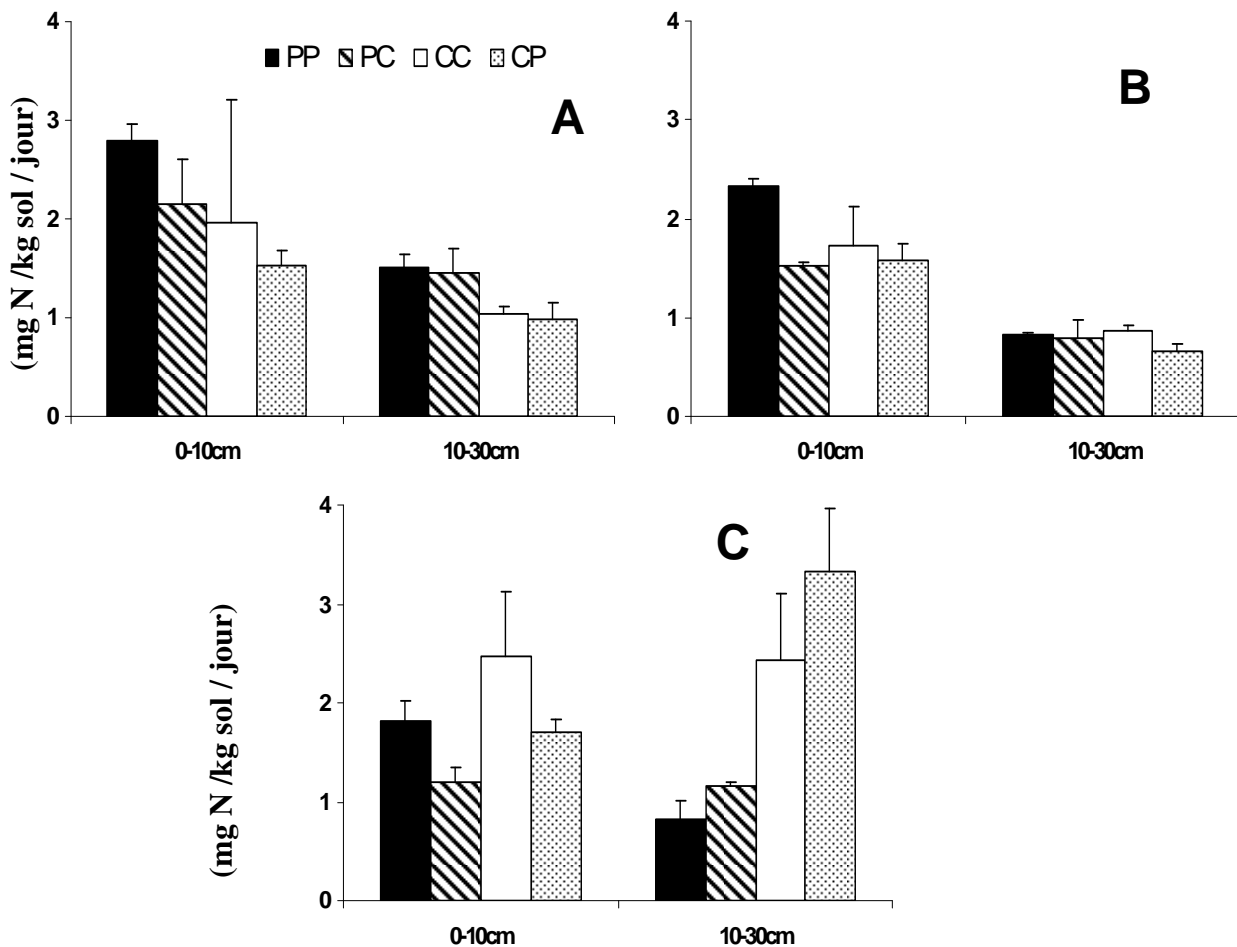
Durant les 2 années d'expérimentation, les vitesses de minéralisation brutes de l'azote dans les sols de prairie (PP) ont été supérieures à celles mesurées dans les sols de culture (CC) (Fig. 2A). Ils étaient en moyenne de 3.2 mg N / kg sol / jour<sub>15</sub> pour PP et de 1.5 mg N / kg sol / jour<sub>15</sub> pour CC (Fig. 3). En juin 2005, trois mois après les changements de gestion, ces flux dans les sols de prairie ont fortement augmenté et atteint des valeurs supérieures à 4mg N / kg sol / jour<sub>15</sub>. Le flux calculé d'organisation (Fig. 2B) est, en moyenne sur les deux ans, du même ordre de grandeur que la minéralisation brute d'azote, c'est-à-dire très supérieur en PP qu'en CC. Etant donné l'apport d'azote ammoniacal effectué pour réaliser la mesure, on considère qu'il s'agit d'une mesure d'organisation potentielle définie par la disponibilité du carbone facilement assimilable et l'activité microbienne en l'absence de limitation par l'azote minéral (ammoniacal). L'approche méthodologique ne permet donc pas de conclure sur l'intensité de la minéralisation nette d'azote, calculée par la différence entre les deux flux bruts de minéralisation et d'organisation (ce n'était pas non plus l'objectif de cette étude).

Le retournement de la prairie (PC) a causé une baisse rapide (<3semaines) et intense des flux qui ont alors atteint des valeurs similaires à celles retrouvées dans les sols sous culture (CC) (Fig. 2A et B). A l'opposé, 2 ans après le semis de la prairie (CP), il n'y a pas eu d'effet sur la minéralisation et l'organisation brute d'azote. A cette date, la comparaison des vitesses mesurées pour la couche 0-10cm et la couche 10-30cm, indique que la minéralisation et l'organisation étaient plus faibles dans la couche 10-30cm que dans la couche 0-10cm et ce, pour tous les traitements (Fig. 4). Dans la couche 10-30cm, il n'existe pas de différences entre PP et CC, CP, PC.

La nitrification (Fig. 2C), estimée consécutivement à l'apport d'azote ammoniacal enrichi en <sup>15</sup>N, représente la nitrification potentielle mesurée sans limitation de l'activité nitrifiante par la disponibilité du substrat. La vitesse de nitrification était très inférieure à celle mesurée pour la minéralisation dans le traitement PP. Par contre, elle était du même ordre de grandeur que celle estimée pour les traitements CC, CP et PC. Au cours du temps, on observe des fluctuations pour tous les traitements mais sans distinction nette, et seule la nitrification dans les sols CC montre une tendance à augmenter à partir de 12 mois (Fig. 2C). La nitrification reste très stable dans les sols PC et CP. La nitrification dans l'horizon 10-30cm était égale ou supérieure à celle mesurée dans l'horizon 0-10cm - à l'exception de PP (Fig. 4C).



**Fig. 3:** Vitesses moyennes de minéralisation, organisation et nitrification (exprimées par jour à 15°C et potentiel hydrique -80 kPa) observées dans la couche 0-10 cm des sols sous prairie et sols de rotation de cultures annuelles. Les valeurs représentent la moyenne ( $\pm$  écart type) de 5 dates sur la période 0-24 mois.

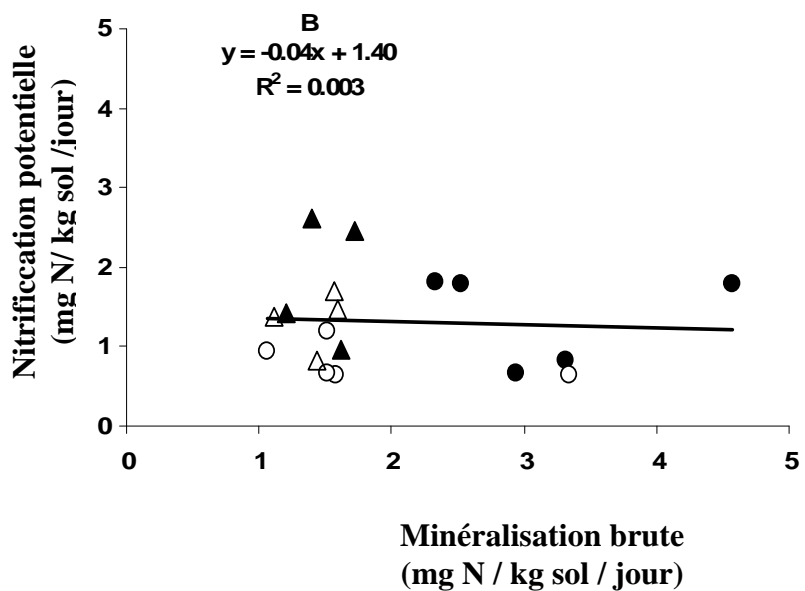
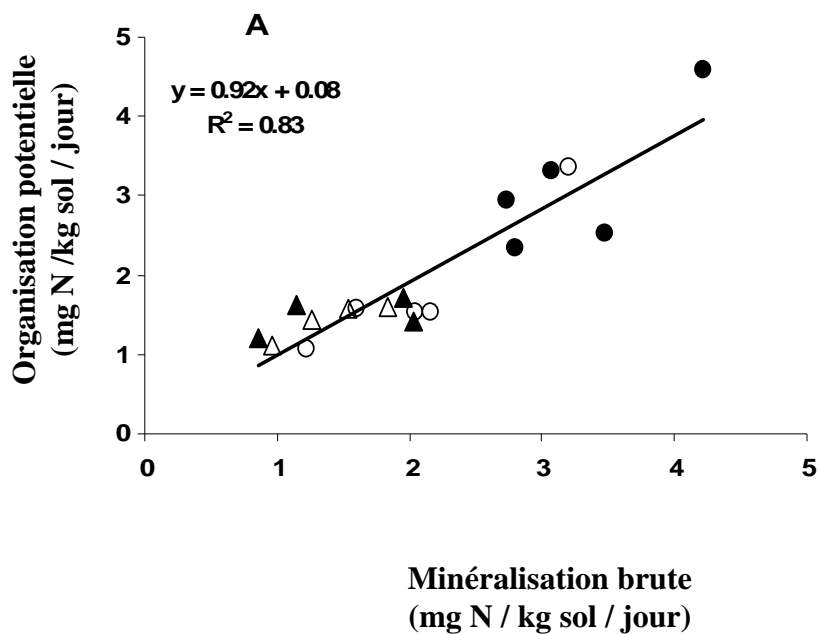


**Fig. 4 :** Flux de minéralisation (A), d'organisation (B), de nitrification (C) 2 ans après les changements de gestion dans 2 horizons de sol (0-10 et 10-30cm).

Une forte corrélation ( $R^2=0.83$ ) a été observée entre les flux de minéralisation et d'organisation pour tous les traitements et toutes les dates, et notamment pour les sols sous prairies (PP et PC à la date  $t_0$ , avant retournement de prairie), une organisation intense était associée à une forte minéralisation, indiquant un turnover de l'azote plus intense sous prairie (Fig. 5A). Par ailleurs, la pente de cette relation indique une proportionnalité proche de 1 entre ces 2 flux ( $y=0.92 x + 0.08$ ). L'organisation d'azote était légèrement supérieure à la minéralisation sur la période 0-3 mois, alors qu'elle devenait inférieure à la minéralisation à 12 et 24 mois, pour tous les traitements. Etant donné que l'apport d'azote minéral (lié à la méthode  $^{15}\text{N}$ ) ne stimule pas la minéralisation d'azote, alors qu'elle peut augmenter l'organisation d'azote (Luxhoi et al., 2005), on peut déduire de cette relation que l'organisation d'azote n'était pas limitée par le flux de d'azote ammoniacal produit par la minéralisation et qu'elle est donc proche de l'organisation réelle. A l'opposé, le flux de nitrification beaucoup moins variable entre traitements, ne montre aucune corrélation avec le flux de minéralisation brute (Fig. 5B).

## 2.2. Carbone Organique Total, Carbone Organique Dissous et Biomasse microbienne

Les teneurs en carbone organique total (COT), en carbone organique dissous (COD) et en C de la biomasse microbienne (BMC) ont été, à chaque prélèvement, significativement supérieures en PP que en CC (Fig. 6 A, B, C), en moyenne  $17\text{g C kg}^{-1}\text{ sol}$  (COT),  $30\text{ mg C kg}^{-1}\text{ sol}$  (COD) et  $545\text{ mg C kg}^{-1}$  (BMC) dans les prairies (traitement CC);  $10\text{ g C kg}^{-1}\text{ sol}$ ,  $14\text{ mg C kg}^{-1}\text{ sol}$  et  $285\text{ mg C kg}^{-1}$  dans les cultures (traitement CC). Le COD est un compartiment très petit qui ne représente qu'environ 5 % du C microbien et  $<0,2\%$  du C total, et dont la taille  $\sim 20\text{-}40\text{ mg C kg}^{-1}\text{ sol}$  est du même ordre de grandeur que la respiration hétérotrophe par jour à  $15^\circ\text{C}$ . Le carbone de la biomasse microbienne représente en moyenne 2,9-3,2 % du C total. La respiration, mesurée au cours de l'incubation des sols de la couche 0-10cm pour l'estimation des flux bruts, a été étroitement corrélée à la taille de la biomasse microbienne indépendamment de la date et du traitement (Fig. 7). Il en résulte que l'activité spécifique de la biomasse (respiration par unité de biomasse, exprimée en  $\text{mg C-CO}_2$  par  $\text{mg C-biomasse}$ ) était en moyenne de 0,043 et était peu variable au cours du temps et remarquablement équivalente pour les traitements PP et CC (excepté à la date 3 mois, où elle atteignait 0,092 (PP) et 0,065 (CC), date à laquelle des flux d'azote élevés ont été aussi mesurés). Cette faible variabilité des proportions de biomasse et d'activité spécifique traduit une variation cohérente et synchrone des différentes variables C au cours du temps.



**Fig. 5 :** Corrélations entre les flux de minéralisation et d'organisation (A) et de nitrification (B) pour toutes les dates et tous les traitements de l'horizon 0-10cm. Les vitesses sont exprimées par jour à 15°C et potentiel hydrique de -80 kPa. ●: Prairies contrôles (PP); ○: Retournement de prairies (PC); ▲: Cultures contrôles (CC); △: Implantation de prairies (CP).

Le retournement de la prairie (PC) a entraîné une baisse significative du COT, et du COD après respectivement 3 et 12 mois et est resté à un niveau intermédiaire, entre PP et CC (Fig. 6A et B). Par contre, dès 3 semaines, on observe pour PC une baisse significative de la biomasse microbienne qui atteint des valeurs similaires à celles retrouvées dans CC au bout de 2 ans, à  $285 \text{ mg C kg}^{-1} \text{ sol}$  (Fig. 6C). L'implantation de prairie (CP) n'a pas eu d'effet significatif sur aucune de ces variables C sur les 2 années de l'expérimentation (Fig. 6 A, B, C).

A 2 ans, les valeurs de biomasse microbienne de la couche 10-30cm ont été identiques quel que soit le traitement et ont atteint des valeurs équivalentes à celles mesurées dans la couche 0-10cm des sols CC, CP, PC (Fig. 8).

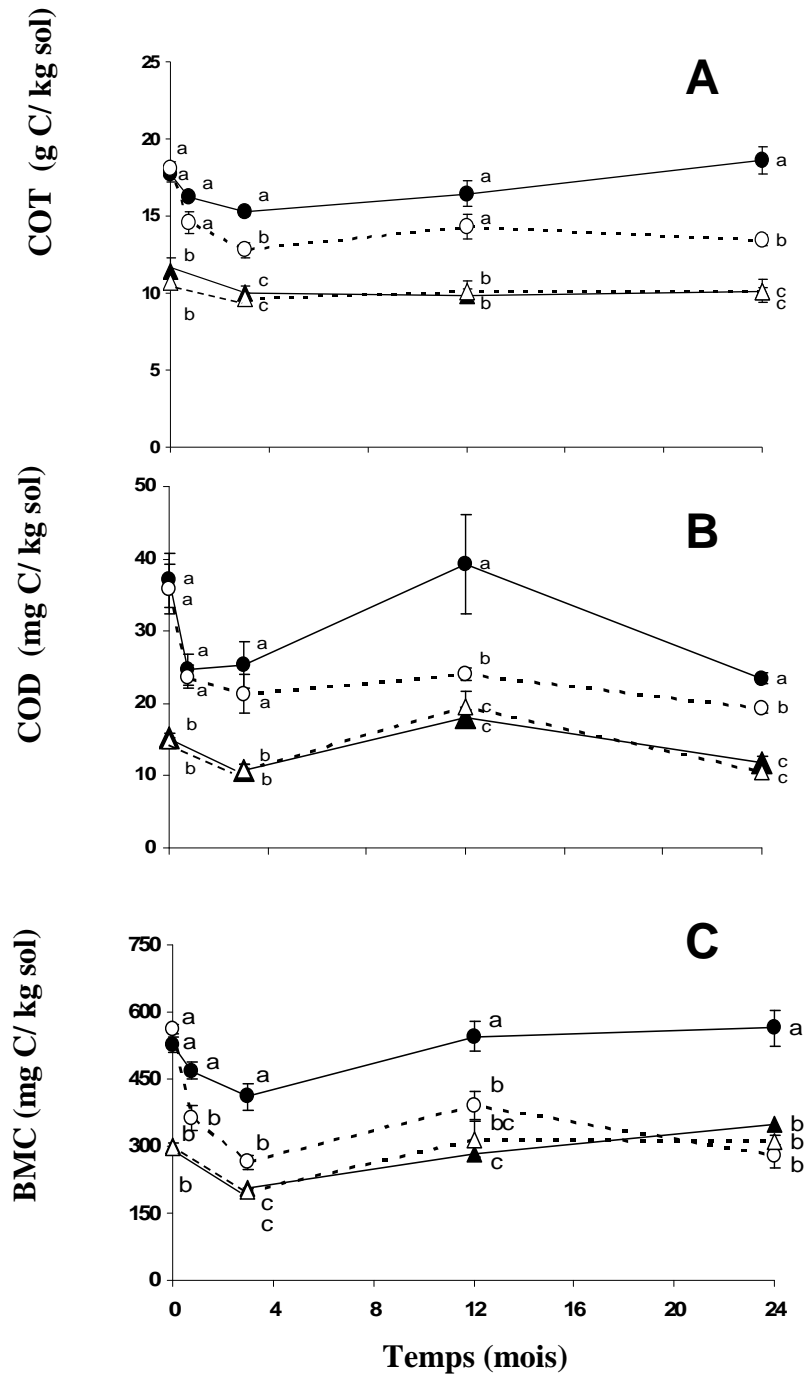
### 2.3. Relations entre flux d'azote et carbone organique

Nous avons constaté une relation étroite entre le flux de minéralisation et les différents compartiments de carbone mesurés (Fig. 9A, B, C), excepté pour la mesure à 3 mois (Juin 2005) du traitement PP. Dans ce cas, le flux de minéralisation PP est très élevé et se détache nettement de la relation avec les variables "carbone". Nous n'avons trouvé aucune raison d'ordre méthodologique pour expliquer le flux atypique obtenu sur les 4 parcelles représentant les répétitions de ce traitement à cette date, nous avons fait le choix de l'exclure du calcul des droites de régression (Fig. 9 A, B, C). Ainsi, les corrélations entre la vitesse de minéralisation brute et COT, COD, BMC sont très fortes ( $R^2=0.67$ ,  $R^2=0.74$ ,  $R^2=0.84$ , respectivement) et s'améliorent si l'on passe du carbone total, au carbone dissous, enfin à la biomasse microbienne. Etant donné la forte corrélation entre les flux de minéralisation et d'organisation, le flux d'organisation est donc aussi fortement corrélé aux compartiments du carbone (données non présentées). Par ailleurs, les concentrations en azote organique étant fortement corrélées au carbone organique, le flux de minéralisation est également très corrélé au contenu en azote organique (données non présentées).

### 2.4. Minéralisation nette de C et N

La mesure de la minéralisation nette du carbone sur le sol maintenu nu après le retournement de prairie (PC) montre que le retournement de prairie a entraîné immédiatement de fortes émissions de  $\text{CO}_2$  en provoquant une émission totale d'environ  $2,5 \text{ t de C-CO}_2 \text{ ha}^{-1}$  à l'issue des 2 mois sur lesquels les flux ont été suivis (Fig. 10). Les émissions de  $\text{CO}_2$  de sol nu en culture (CC) ont été beaucoup plus faibles et ont atteint moins de  $1 \text{ t de C-CO}_2 \text{ ha}^{-1}$  sur la même période. La minéralisation supplémentaire due à la destruction de la prairie représente





**Fig. 6** : Cinétiques du Carbone Organique Total COT (A); du Carbone Organique Dissous COD (B) et de la biomasse microbienne carbone BMC (C) dans l'horizon 0-10cm. Les lettres différentes signifient significativement différent à un niveau de  $p < 0.05$ . ●: Prairies contrôles (PP); ○: Retournement de prairies (PC); ▲: Cultures contrôles (CC); △: Implantation de prairies (CP).

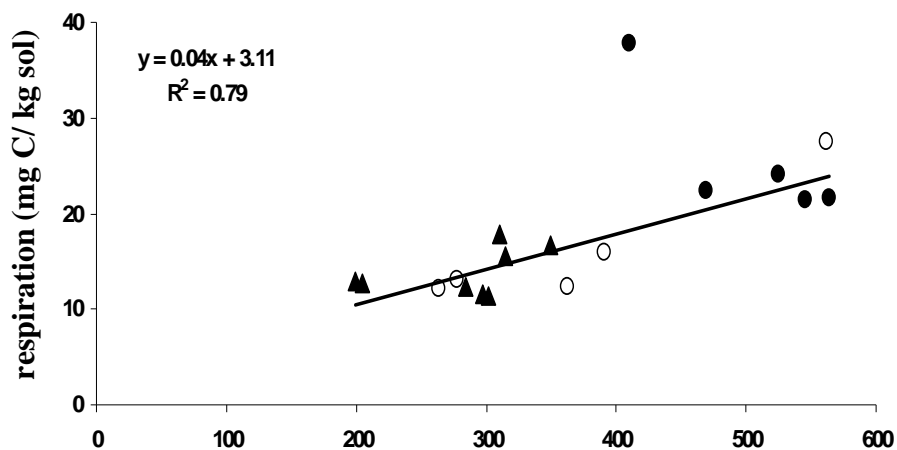
donc à court terme environ 1.5 tonne de C ha<sup>-1</sup>. Basé sur l'estimation de la biomasse végétale incorporée à la destruction de la prairie, et en faisant l'hypothèse que seule la végétation prairiale en décomposition est à l'origine du surplus de minéralisation, cette émission de carbone représenterait donc 60 % du C incorporé de la biomasse végétale.

Le retournement de la prairie a généré de fortes quantités d'azote minéral dans le sol de façon rapide. On a pu constater que la quantité d'ammonium dans le sol de prairie retournée augmentait rapidement après le retournement avec un pic de 45 kg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.ha<sup>-1</sup> au 30 mars. Ensuite, cette quantité diminue pour retrouver celle de la prairie (Fig. 11). Le sol maintenu sous prairie (PP) présente de faibles quantités d'azote minéral, tant en ammonium (moins de 20 kg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.ha<sup>-1</sup>) qu'en nitrate (moins de 3 kg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.ha<sup>-1</sup>). Dans les sols contrôlés sous culture, on observe une absence d'accumulation de l'azote minéral au cours du temps. L'azote minéral est essentiellement situé dans le premier horizon (0-30 cm) avec une quantité relativement stable variant de 12 à 20 kg N.ha<sup>-1</sup>, majoritairement sous la forme NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Les horizons inférieurs (30-60 cm et 60-90 cm) présentent des valeurs inférieures et stables de 6 kg N.ha<sup>-1</sup> (données non montrées). Compte tenu des faibles précipitations à cette période, on peut considérer qu'il n'y a pas eu de lessivage de nitrate. Il est alors possible d'estimer simplement la minéralisation nette par bilan. Pour PP, cette estimation est faite en tenant compte de l'absorption nette d'azote par la culture (C. Léonard, 2005. Résultats non montrés). On peut donc faire un bilan complet d'azote aux pertes gazeuses près (N<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, NO<sub>x</sub>, NH<sub>3</sub>). Les valeurs nettes d'azote minéralisé calculées par différence entre PP et PC correspondent à + 80 kg N ha<sup>-1</sup>, soit environ 80 % de l'azote apporté par les litières, si l'on considère que seule la végétation prairiale est à l'origine de la minéralisation nette accrue.

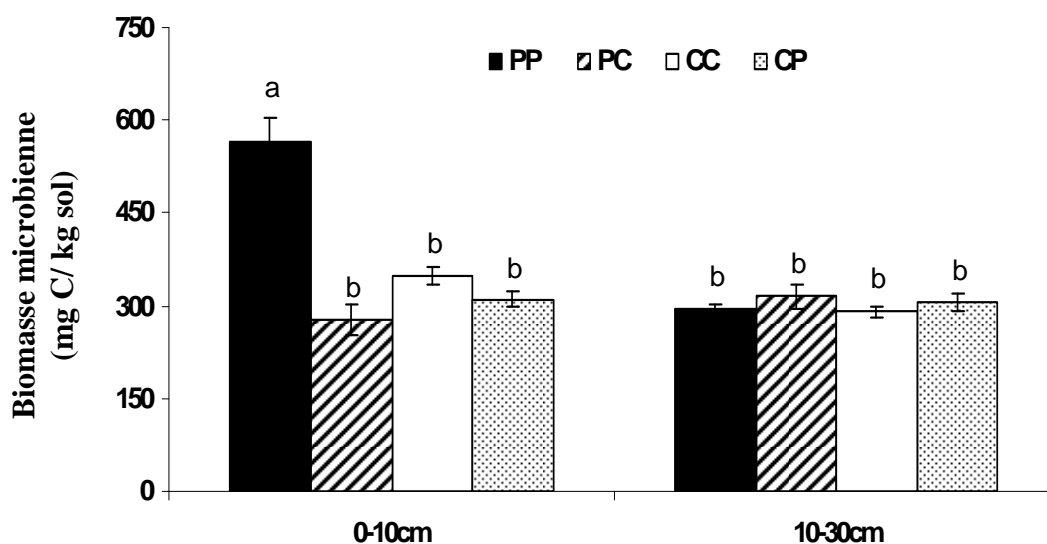
### **3. Discussion**

#### 3.1. Fonctionnement comparé des sols sous prairie et sous grande culture

La comparaison des flux d'azote sous culture et sous prairie indique des flux de minéralisation et organisation globalement deux fois plus élevés sous prairie que sous grandes cultures. Cette différence était attendue et est en accord avec les études disponibles dans la littérature, mais dans certaines situations, les différences sont beaucoup plus importantes que celles observées sur Lusignan (par exemple, synthèse de résultats de Booth et al., 2005). La différence observée entre les deux systèmes est généralement attribuée à un turnover microbien plus intense sous prairie qui est alimenté en permanence par l'apport de litières racinaires et rhizodépôts par la prairie (Stockdale et al., 2002, Silva et al., 2005). Ceci est



**Fig. 7 :** Corrélations entre la respiration microbienne et la biomasse microbienne pour toutes les dates (à l'exception du T3mois) et tous les traitements de l'horizon 0-10cm. Les vitesses sont exprimées par jour à 15°C et potentiel hydrique de -80 kPa. ●: Prairies contrôles (PP); ○: Retournement de prairies (PC); ▲: Cultures contrôles (CC); △: Implantation de prairies (CP).



**Fig. 8 :** Biomasse microbienne 2 ans après les changements de gestion dans 2 couches de sol (0-10 et 10-30cm). Les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différent à un niveau de  $p < 0.05$

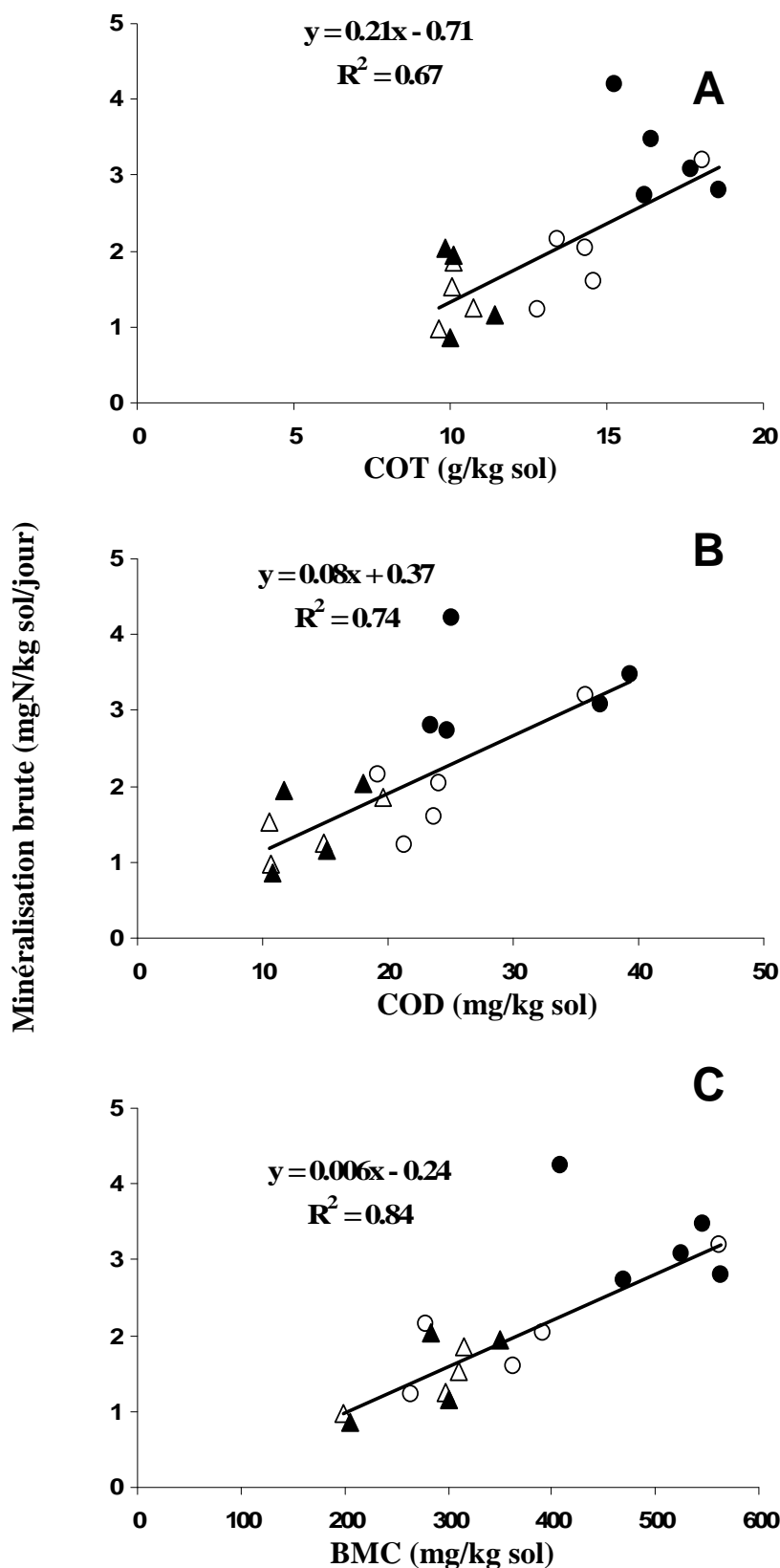
confirmé par le niveau de biomasse microbienne plus élevé sous prairie que sous grande culture.

Trois mois après le début de l'expérimentation, la minéralisation et l'organisation ont très fortement augmenté sans que cette augmentation soit liée à une augmentation des différents compartiments carbone. Etant donné la forte sécheresse ayant sévi pendant l'été 2005, nous pouvons supposer que l'humectation du sol pour apporter le  $^{15}\text{N}$  pour mesurer les flux bruts a sensiblement activé le métabolisme des microorganismes soumis à un stress hydrique plus important que lors des autres prélèvements.

La mesure effectuée, à 2 ans, sur les couches 0-10 et 10-30cm a montré que dans les sols cultivés, aucune stratification verticale des flux de minéralisation et d'organisation n'était observée en raison du mélange des deux couches par le labour, annuellement. Par contre, dans les sols de prairie, nous avons pu observer, comme Accoe et al. (2004) la stratification verticale du flux de minéralisation et d'organisation avec, dans l'horizon 10-30cm, des valeurs beaucoup plus faibles que dans l'horizon 0-10cm et équivalentes aux valeurs mesurées dans les 2 horizons des cultures. Cette forte stratification pour la prairie correspond au gradient observé pour l'enrichissement en carbone et en activité microbienne, qui s'établit progressivement sous la prairie en place.

### 3.2. Effets des changements de mode de gestion sur la dynamique d'azote et de carbone

Le retournement de prairie a entraîné une baisse rapide et intense des flux de minéralisation et d'organisation, dès la mesure à 3 semaines, et qui ont atteint, en moins de 3 mois, les valeurs observées dans les sols en cultures depuis de nombreuses années. Etant donné les valeurs de flux environ 2 fois plus faibles dans l'horizon 10-30cm, nous pouvons avancer l'hypothèse que, sur le court terme, la baisse des teneurs en C et des flux d'azote après le retournement de prairie est tout d'abord expliquée par le mélange par le labour de la couche 0-10cm et de la couche 10-30cm, via un effet de dilution de la matière organique, de la biomasse microbienne et des flux associés. A moyen terme, la conversion de la prairie par une culture annuelle (le maïs la première année, puis le blé la deuxième année) diminue la fourniture en carbone à la microflore hétérotrophe et est à l'origine du maintien de ces flux à des niveaux plus faibles. Nous aurions pu s'attendre à observer une augmentation des flux d'azote suite au retournement de prairie impliquant l'incorporation de  $7 \text{ t ha}^{-1}$  de biomasse végétale dans le sol. Il est donc probable que cette augmentation transitoire des flux s'est produite très rapidement, à une échelle de temps inférieure à notre pas de prélèvement, et était donc terminée à la mesure effectuée à 3 semaines. En effet, les résultats obtenus sur les

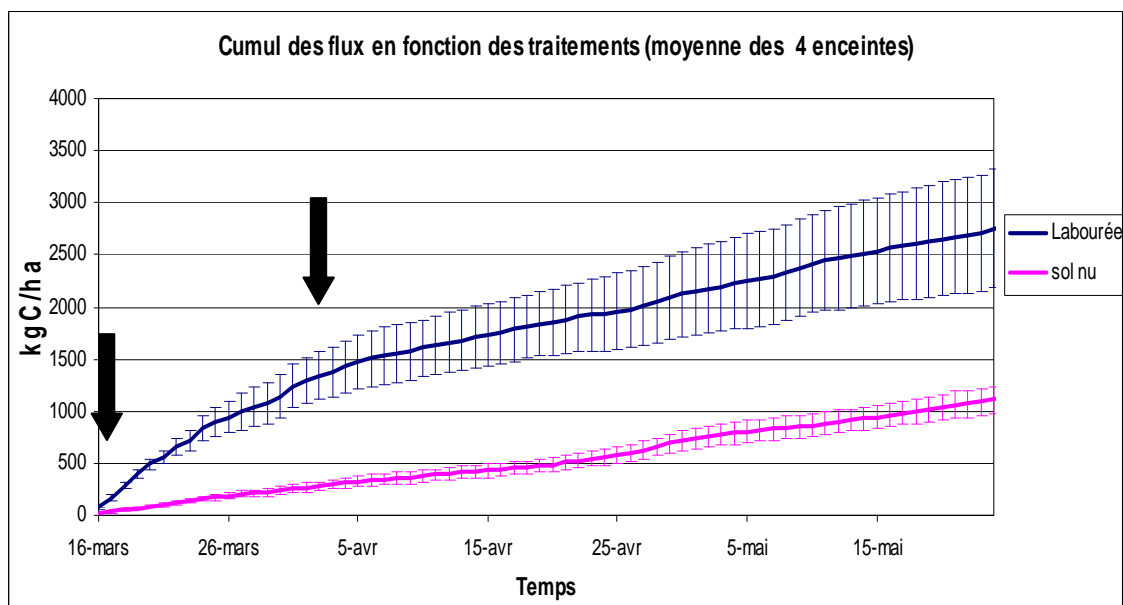


**Fig. 9** : Corrélations entre le flux brut de minéralisation et le COT, COD et BMC pour toutes les dates et tous les traitements. Bien qu'il soit représenté sur chaque graphique, les droites de régression, leurs équations et le calcul du  $R^2$  excluent le point PP à 3 mois. ●: Prairies contrôles (PP); ○: Retournement de prairies (PC); ▲: Cultures contrôles (CC); △: Implantation de prairies (CP).

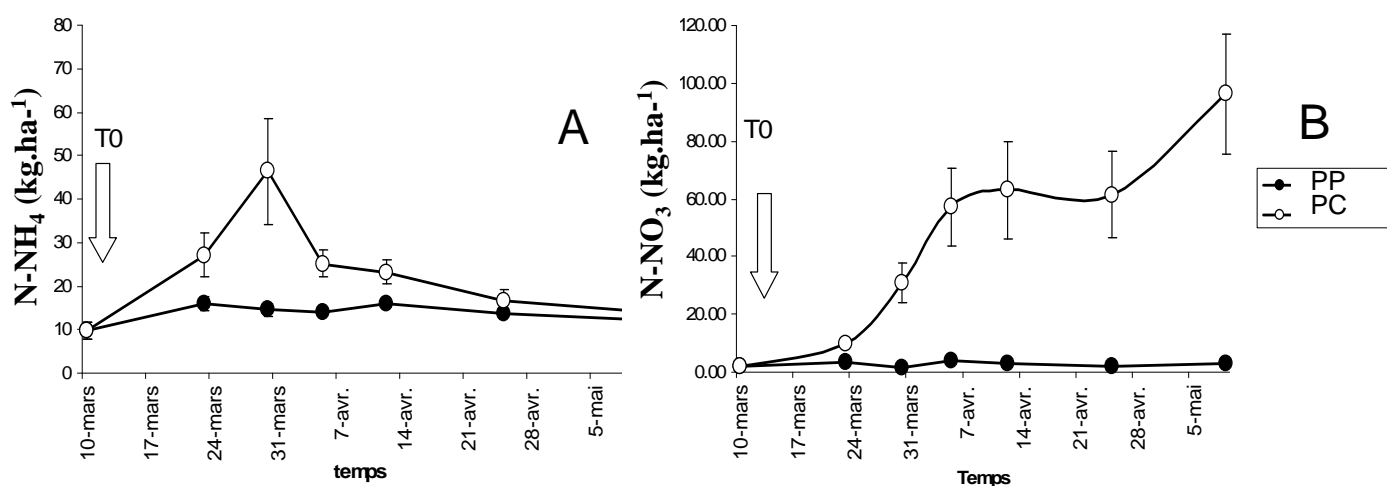
émissions de CO<sub>2</sub> et l'accumulation d'azote minéral dans le sol (Master de C. Léonard, 2005), montrent une forte augmentation de la minéralisation nette du C et de l'N surtout pendant les premières semaines. De manière cohérente avec cette augmentation fugace, Recous et al. (1999) et Shindo et al (2004) ont montré, après incorporation de pailles de blé, une augmentation des flux de minéralisation et organisation après seulement 7 jours puis une tendance vers la baisse de ce flux dès 1 mois.

L'implantation de prairie n'a pas provoqué de modification significative des compartiments carbonés mesurés ni des flux bruts d'azote même 2 années après le semis. La sécheresse estivale de 2005 a probablement atténué les effets de ces changements de gestion étant donné le retard dans la croissance par la prairie semée en 2005. L'analyse des données après 3 années sera donc importante pour apprécier le temps de réponse des flux d'azote et de carbone dans le contexte de l'installation d'une prairie. Cependant, Accoe et al. (2004) ont mesuré des flux de minéralisation aux alentours de 1.3 mg N /kg sol / jour pour des prairies installées depuis 6 et 14 ans alors que les prairies âgées de 50 ans présentaient un flux de minéralisation nettement supérieur (3 mg N / kg sol / jour). En extrapolant à partir de cette étude, on peut anticiper que la prairie nouvellement implantée ne présentera que très progressivement les caractéristiques d'une prairie implantée depuis de nombreuses années.

Concernant les compartiments mesurés du carbone (COT, COD et C biomasse), les effets de l'implantation de prairie sont également non détectables au bout de 2 ans. Par contre, le retournement de prairie a entraîné une baisse du COT et du COD après respectivement 3 et 12 mois, mais sans atteindre les niveaux observés sous culture annuelle. Deux ans après la destruction de la prairie, la quantité de COT de la couche 0-10 cm de parcelle en prairie reste significativement supérieure à celle la couche 0-10 cm des parcelles restées en grande culture. Ceci peut signifier que la nature du carbone accumulé sous prairie présente, du point de vue chimique, des caractéristiques lui conférant une certaine stabilité. L'étude plus poussée de ces caractéristiques ne concerne pas ce travail de thèse, mais est poursuivi par ailleurs (Rumpel et al., 2008). La biomasse microbienne a été affectée plus rapidement par le retournement de prairie (dès 3 semaines) et a atteint les niveaux observés dans les cultures en moins de 2 années, contrairement aux COT et COD qui se maintiennent à des niveaux supérieurs. Nous émettons l'hypothèse que la différence dans la cinétique de réponse des différents compartiments carbonés est due au turnover plus rapide de la biomasse microbienne et à son alimentation préférentielle par du C récent issu du fonctionnement du couvert végétal (rhizodépôts).



**Fig. 10** : Flux cumulés de  $\text{CO}_2$  après labour des cultures (traitement CC) et des prairies labourées (PC). Les flèches indiquent les dates de prélèvements de sols sur cette période (T0 et 3 semaines après le changement de gestion). Données issues du Master Recherche de C. Léonard.



**Fig. 11** : Quantités d'azote ammoniacal (A) et nitrique (B) sur les parcelles maintenues en prairies (PP) et après le retournement des prairies (PC). Données issues du Master Recherche de C. Léonard.

### 3.3. Rôle du cycle interne de l'azote sur la disponibilité nette de N dans le sol

L'importance relative des processus de minéralisation, organisation et nitrification détermine dans les sols la quantité et la forme chimique sous laquelle l'azote minéral est présent. La durée de "résidence" de l'azote sous forme ammoniacale ou nitrique qui en découle, détermine potentiellement les risques de pertes par volatilisation, par lixiviation, et la disponibilité pour la plante. Dans l'approche de quantification de ces processus par la technique des flux bruts que nous avons utilisée, les flux d'organisation et de nitrification sont augmentés par l'apport de  $^{15}\text{NH}_4$  et ils représentent donc des flux potentiels. Pour la minéralisation, il n'y a pas de différence entre flux potentiel et flux réel, car le compartiment organique qui en est la source est très grand, et l'absence de réponse de la minéralisation brute à l'apport d'azote a été démontrée plusieurs fois (e.g. Luxhoi et al. 2005). Ceci signifie que la comparaison de ces trois flux devient possible pour identifier les processus qui contrôlent le cycle interne.

La corrélation très forte entre les flux de minéralisation et d'organisation observée pour tous les traitements et leur dépendance à la teneur en matière organique et à l'activité microbienne hétérotrophe du sol, a déjà été montrée dans des études ayant porté sur les effets de l'incorporation de résidus végétaux (Recous et al., 1999), l'augmentation du  $\text{CO}_2$  sur les flux d'azote (Richter et al., 2003), la comparaison du fonctionnement des prairies et forêts (Silva et al., 2005), de systèmes en semis direct (Luxhoi et al., 2008). L'importance relative des deux flux (Fig. 5) indique que l'essentiel de l'azote minéralisé peut être potentiellement organisé, laissant une part relativement faible de l'azote disponible pour la nitrification (réelle).

La nitrification potentielle ne répond pas de la même manière aux pratiques. Pour la prairie, on voit que, en conditions potentielles et tous facteurs égaux par ailleurs, la nitrification potentielle est deux fois plus faible que la minéralisation (Fig. 2), indiquant que la nitrification est potentiellement l'étape limitante de l'accumulation de nitrate dans les sols. Ceci est confirmé par l'accumulation temporaire d'azote ammoniacal en sol prairial (données de C. Léonard), qui n'est pas observé sous grande culture. Néanmoins, étant donné la forte organisation potentielle, nous faisons l'hypothèse que l'essentiel de l'azote minéralisé est organisé par la microflore, et que la nitrification réelle est limitée par un faible flux de  $\text{NH}_4$  disponible. En effet, les nitrifiants, microorganismes à faible croissance, sont de faibles compétiteurs du  $\text{NH}_4$  par rapport aux hétérotrophes qui organisent ce substrat. Par contre en sol de grande culture, on observe que la nitrification potentielle est légèrement supérieure à la minéralisation et à l'organisation (Fig. 2), ce qui indiquerait que la minéralisation pilote, en





amont, la disponibilité en azote minéral dans le système. Ceci a déjà été observé dans les systèmes de cultures annuelles (Booth et al., 2005).

A partir de la synthèse de nombreuses études, Booth et al. (2005) ont conclu que la nitrification pouvait être décrite par une fonction log-linéaire, augmentant rapidement à faible taux de minéralisation et ne variant que peu dans les situations de forte minéralisation. A l'opposé, ils ont proposé de décrire l'organisation grâce à une fonction linéaire. Ces auteurs ont aussi exprimé la concurrence entre les processus à partir des rapports de flux Nitrification/Minéralisation (N/M) et Nitrification/Organisation de l'ammonium (N/Ia). N/M était égal à 0,38 (prairies) et 1,13 (grandes cultures), et N/Ia était égal à 0,61 (prairies) et 1,86 (grandes cultures), indiquant pour les deux paramètres que la nitrification est l'étape limitante dans les systèmes prairiaux, alors que dans les systèmes de grandes cultures c'est la production d'azote ammoniacal (minéralisation) qui contrôle la disponibilité globale de l'azote. Nos résultats confirment ces hypothèses. Ainsi, dans le système prairial étudié, le  $\text{NH}_4$  serait préférentiellement dirigé vers l'organisation puis vers la nitrification. Ce contraste entre la réponse de la minéralisation d'une part avec l'organisation et d'autre part avec la nitrification est aussi cohérent avec les résultats de Banning et al. (2008). Après réhabilitation de sols miniers, ces auteurs ont pu observer une augmentation des flux de minéralisation et d'organisation avec le temps, et des valeurs similaires entre ces 2 flux alors qu'en parallèle, la nitrification restait stable et faible, même dans les sols réhabilités depuis 26 ans.

#### 3.4. Relations entre flux d'azote et dynamique du carbone

Les différents compartiments du carbone étudiés ici (COT, COD, et BMC) sont tous fortement corrélés au flux de minéralisation brute. Selon Luxhoi et al. (2008), le compartiment de carbone organique ne reflète pas complètement la disponibilité du carbone pour les microorganismes et n'explique que 70 à 77 % de la variabilité observée. Nos résultats confirment ces relations. D'après nos données et celles de la littérature, le carbone organique soluble (COD) est un compartiment à renouvellement très rapide, que l'on peut considérer à la fois comme substrat pour la microflore hétérotrophe et alimenté par le renouvellement de cette biomasse. Le maintien de ce compartiment à un niveau intermédiaire pour le traitement PC (parcelles après retournement de la prairie) entre les valeurs observées dans les parcelles en prairie (PP) et les parcelles restées toujours en culture annuelle (CC), suggère que le compartiment soluble est principalement lié au compartiment organique total (COT) qui l'alimente.



Parmi ces différentes variables, la biomasse microbienne présente la meilleure corrélation et est la seule à suivre la même cinétique que le flux de minéralisation après le retournement de prairie ( $R^2=0.84$ ). Les évolutions des flux de minéralisation et d'organisation sont donc fortement pilotées par des changements de biomasse microbienne. Luxhoi et al. (2006, 2008) ont démontré cette forte corrélation entre les transformations brutes de l'azote et la respiration du sol et ont proposé de prédire les flux bruts à partir de mesures de respiration. Zaman et al. (1999) et Schimel et Weintraub (2003) expliquent ces relations par le fait que la biomasse microbienne hétérotrophe produit les exoenzymes responsables la minéralisation de la matière et est donc la première responsable des flux observés.

#### **4. Conclusion**

La gestion des parcelles en prairies ou en rotation de grande culture, induit des différences importantes dans la répartition du carbone organique des sols, et de la dynamique de la biomasse microbienne hétérotrophe. La dynamique de l'azote est étroitement associée à celle du carbone, et sous prairie l'ensemble du cycle de minéralisation-organisation de l'azote est fortement stimulé, en comparaison avec les grandes cultures. Cependant étant donné l'intensité de l'organisation microbienne, l'ordre de grandeur de la minéralisation nette n'est probablement pas supérieur à celui constaté en sol de grande culture, même si l'approche méthodologique choisie (technique des flux bruts d'azote) n'est pas adaptée pour le calculer précisément. La nitrification potentielle ne répond pas de la même manière à la dynamique du carbone, ce qui conduit à une hiérarchie différente des processus qui contrôle la disponibilité de l'azote minéral dans les sols prairiaux et de culture étudiés, sans doute parce que dans ces systèmes l'essentiel de l'azote minéralisé est organisé, sans être disponible pour les nitrifiants.

Suite au retournement de prairie qui conduit aux mélanges des couches superficielles du sol, et à la destruction du couvert prairial, une minéralisation d'azote très forte est constatée en quelques semaines, associée à une forte minéralisation du carbone. Ceci résulte d'une part de l'action mécanique de travail du sol et d'autre part de la décomposition des résidus végétaux apportés par la destruction du couvert. Notre pas de temps de mesure des flux bruts n'a pas permis de mettre en évidence ce pic d'activité microbienne, qui se produirait donc dans les premiers jours à premières semaines du retournement. On constate au contraire que les flux de minéralisation et d'organisation d'azote sont fortement et rapidement réduits, jusqu'à atteindre les niveaux observés en culture. On peut donc penser que l'alimentation du sol en carbone, par les exsudats et litières racinaires des espèces prairiales est le principal facteur de



maintien des niveaux élevés d'activité microbienne hétérotrophe et de flux de minéralisation et organisation associés. Cet effet si drastique démontre donc que la nouvelle gestion (mise en culture annuelle) pilote très rapidement les flux d'azote du système, alors que le niveau de carbone organique total reste influencé plus longtemps par la gestion passée. Par contraste, même après 2 années, la prairie nouvellement implantée ne modifie pas significativement les flux d'azote observés sous cultures annuelles. La mesure réalisée après 3 ans (non disponible au moment de la rédaction de la thèse) aura de l'importance pour comprendre cette cinétique de différenciation.



## **Chapitre 6**

### **Discussion générale et perspectives**





---

## Sixième chapitre :

### Discussion générale et perspectives

---

#### **1. Originalités de notre étude**

##### *Un travail permettant d'étudier l'effet de changements de gestion des agrosystèmes*

Très peu d'études ont jusqu'alors porté sur la réponse des communautés bactériennes du sol face aux changements des modes de gestion des agroécosystèmes, plus encore sur les temps de réponse des communautés et face à des changements opposés de mode de gestion. Pour notre travail de thèse, nous nous sommes placés dans 3 différents contextes de changements de mode de gestion : (i) l'intensification / la désintensification de la gestion des prairies par le pâturage ; (ii) la conversion de prairies temporaires en culture / la conversion de cultures en prairies dans le cadre de rotation cultures/prairies temporaires ; (iii) l'application / l'arrêt du labour sur des sols de culture. Ce type de travail est important pour comprendre le fonctionnement du système sol vis-à-vis de la gestion actuelle des prairies et des terres arables où les modes de gestion sont moins pérennes qu'autrefois. Cette démarche d'étude n'a été prise en compte, à notre connaissance, que dans quelques études (3 analysant les effets d'alternance prairie-culture (Garbeva et al., 2006; Salles et al., 2006b; Salles et al., 2006a) ; une analysant les effets de l'application et l'arrêt de la fertilisation (Hatch et al., 2000) ; et une analysant les effets de l'application et de l'arrêt du labour (Pankhurst et al., 2002).

Ce contexte de changement de mode de gestion présentait également l'intérêt de fournir des situations écosystémiques soumises à des changements plus propices à la décorrélation et à l'identification des variables clés pilotant le fonctionnement du système sol en général, et de communautés bactériennes modèles en particulier, que dans des situations où le mode de gestion est bien établi et constant depuis longtemps. Par exemple, à Boigneville dans les situations de labour et de semis direct où le même mode de gestion est utilisé depuis plus de 13 ans, nous avons pu observer que les différents niveaux d'activité nitratante étaient corrélés à différents types de structures génétiques de la communauté nitratante du type *Nitrobacter*, et à d'autres variables du sol, comme les effectifs bactériens de cette communauté et le carbone organique. L'étude de la réponse du système sol au cours des 18 mois qui suivent un changement de gestion (ici application et arrêt du labour) a permis d'observer que, après 4 mois, les changements d'activité de cette communauté n'étaient plus



corrélés aux changements de structure génétique, ce qui a permis d'identifier les variables (effectifs de la communauté bactérienne et disponibilité en azote dans le sol) réellement importantes pour mieux comprendre le niveau d'activité de cette communauté bactérienne.

### ***Une comparaison des effets des changements de mode de gestion dans 3 situations agronomiques différentes et pour différentes communautés bactériennes***

Notre étude a porté sur trois situations agronomiques au premier abord très différentes, avec des gestions agronomiques bien différentes (type de pâturage par des ovins en prairie / type de travail du sol / type de rotations culturales), et subissant des changements de leur modes de gestion très différents. Pour les 2 situations de labour-non labour et prairie-culture, ces 2 sites présentaient de nombreuses différences en terme de climat, de sols, de gestion culturale. De plus, le site de Boigneville correspondait à des systèmes de culture quasiment similaires puisqu'ils ne différaient que par la technique de labour (rotations de culture, apports d'engrais et phytosanitaires identiques). A l'inverse, le site de Lusignan présentait des situations plus différentes puisque prairies et cultures étaient gérées très différemment en accord avec la pratique agronomique. Les conséquences des changements de gestion se révélaient également être différentes : pour Lusignan, le retournement de la prairie a mis en œuvre une action physique de travail et déplacement du sol, la destruction du couvert végétal et l'incorporation de la biomasse détruite au sol, sa décomposition, ainsi qu'un arrêt brutal des flux de carbone rhizodéposé par les plantes prairiales dans le sol. Dans le cas des cultures annuelles à Boigneville, le labour du sol maintenu en semis direct depuis 13 ans dans les rotations de cultures annuelles n'a principalement impliqué qu'une action 'physique' du travail du sol.

Cependant, pour les 3 dispositifs expérimentaux, on peut distinguer deux grands scénarios de changement de mode de gestion :

- (i) les agrosystèmes subissent l'application d'un nouveau mode de gestion entraînant d'intenses changements des conditions environnementales et de la disponibilité en substrats pour les microorganismes (application du pâturage sur des prairies non pâturées, installation d'une culture sur des sols prairiaux, mise en labour de sols de culture préalablement en semis direct);
- (ii) les agrosystèmes subissent l'application d'un nouveau mode de gestion entraînant un changement très progressif des conditions environnementales et de la disponibilité en substrats pour les microorganismes (arrêt du pâturage sur des prairies pâturées, installation



d'une prairie sur des sols de culture, arrêt du labour de sols de culture préalablement labourés chaque année).

Concernant plus précisément les 2 contextes de changements labour-non labour et prairie-culture, ces 2 sites avaient en plus en commun de subir d'une part (i) un labour de systèmes initialement non labourés (culture en semis direct pour Boigneville et prairie pour Lusignan) et d'autre part (ii) un arrêt du labour de systèmes initialement labourés (cultures avec sols labourés dans les 2 cas).

Etudier ainsi trois situations agronomiques ayant des caractéristiques à la fois communes et différentes avait pour ambition à la fois de définir les effets à caractère générique des changements de gestion sur les communautés bactériennes des agrosystèmes, et d'identifier des processus clés spécifiques de situations agronomiques données.

Une autre originalité de notre travail a été d'étudier des communautés bactériennes du cycle de l'azote présentant des caractéristiques écologiques et des niveaux de diversité contrastés, en portant notre effort conjointement sur 3 caractéristiques de ces communautés: activité, effectif et structure génétique.

### ***Un travail visant à relier les réponses de communautés bactériennes aux réponses des compartiments organiques du sol et des flux entre ces compartiments***

Un de nos objectifs a été d'obtenir une vision la plus intégrée possible du fonctionnement des processus microbiens du cycle de l'azote dans un agrosystème faisant face à des changements de mode de gestion. C'est pourquoi nous avons essayé de caractériser simultanément les réponses des communautés bactériennes et les variables du sol pertinentes pour ces communautés. Cette démarche d'étude environnementale n'est pas souvent adoptée en écologie microbienne, en raison notamment de la lourdeur des expérimentations et manipulations que cela suppose. Par exemple, on peut citer l'étude de Buckley et Schmidt, (2001) qui a porté sur des sols où la culture céréalière avait été abandonnée pour laisser place à des prairies naturelles. Ces auteurs ont observé que 7 années après ce changement de gestion, la structure génétique de la communauté bactérienne ne ressemblait ni à celle retrouvées dans les sols toujours cultivés ni à celle des sols en prairie. Or, cette étude n'a caractérisé aucune variable trophique ou environnementale pouvant expliquer une telle réponse de la structure de la communauté. Sachant que les sols de prairies ont généralement des stocks de carbone plus élevés que les sols cultivés et que ces stocks nécessitent plusieurs années voire dizaines d'années pour se constituer, la mesure et la caractérisation de cette

<p>Changement de gestion et principaux effets sur le sol</p>	<p><b>Application du labour:</b> "mélange" de sol sur 20 à 30cm</p>	<p><b>Modification du pâturage :</b> modifications de l'apport en substrat azoté (urée) et du fonctionnement racinaire (exudation racinaire...)</p>	<p><b>Arrêt du labour:</b> apport de matière organique en surface avec création progressive d'un mulch et enrichissement progressif en MO de la couche de surface</p>
<p>Intensité des changements environnementaux dans le sol liés aux changements de gestion</p>			
<p>Réponses observées de la nitrification (NOEA ou NEA)</p>			
<p>Résistance</p>	<p>Aucune</p>	<p>&lt;4 mois (arrêt) et &lt;1 an (application)</p>	<p>&gt;2 ans</p>
<p>Temps pour que la nouvelle gestion pilote l'activité</p>	<p>Immédiat</p>	<p>&lt;4 mois (arrêt) et &lt;1 an (application)</p>	<p>&gt;2 ans</p>

**Fig.1 :** Synthèse des cinétiques de changement de l'activité de nitrification (NOEA ou NEA) observées après différents types de changement de gestion. Nous avons observé des cinétiques qualitativement très similaires pour la DEA.

variable aurait pu être intéressante pour expliquer la réponse observée sur la structure génétique.

Un autre objectif a été d'utiliser les résultats obtenus sur les caractéristiques des communautés afin de mieux comprendre, sur une situation, les modifications des transformations microbiennes de l'azote (aussi appelées flux bruts) ainsi induites par les modes de gestion. En effet, à notre connaissance seules deux études (portant sur les effets de différents cultivars de riz et de différents niveaux de la fertilisation Mendum et al., 1999; Briones et al., 2002) ont cherché à comprendre les modifications des flux bruts de nitrification en étudiant les modifications des caractéristiques de la communauté bactérienne nitrifiante. Concernant le flux de minéralisation, on peut citer l'étude de Cookson et al. (2005) qui a permis de montrer une relation significative entre le flux brut de minéralisation et la structure de la communauté bactérienne. Dans les deux cas, il ne s'agissait cependant pas de déterminer ces flux suite à un changement de mode de gestion.

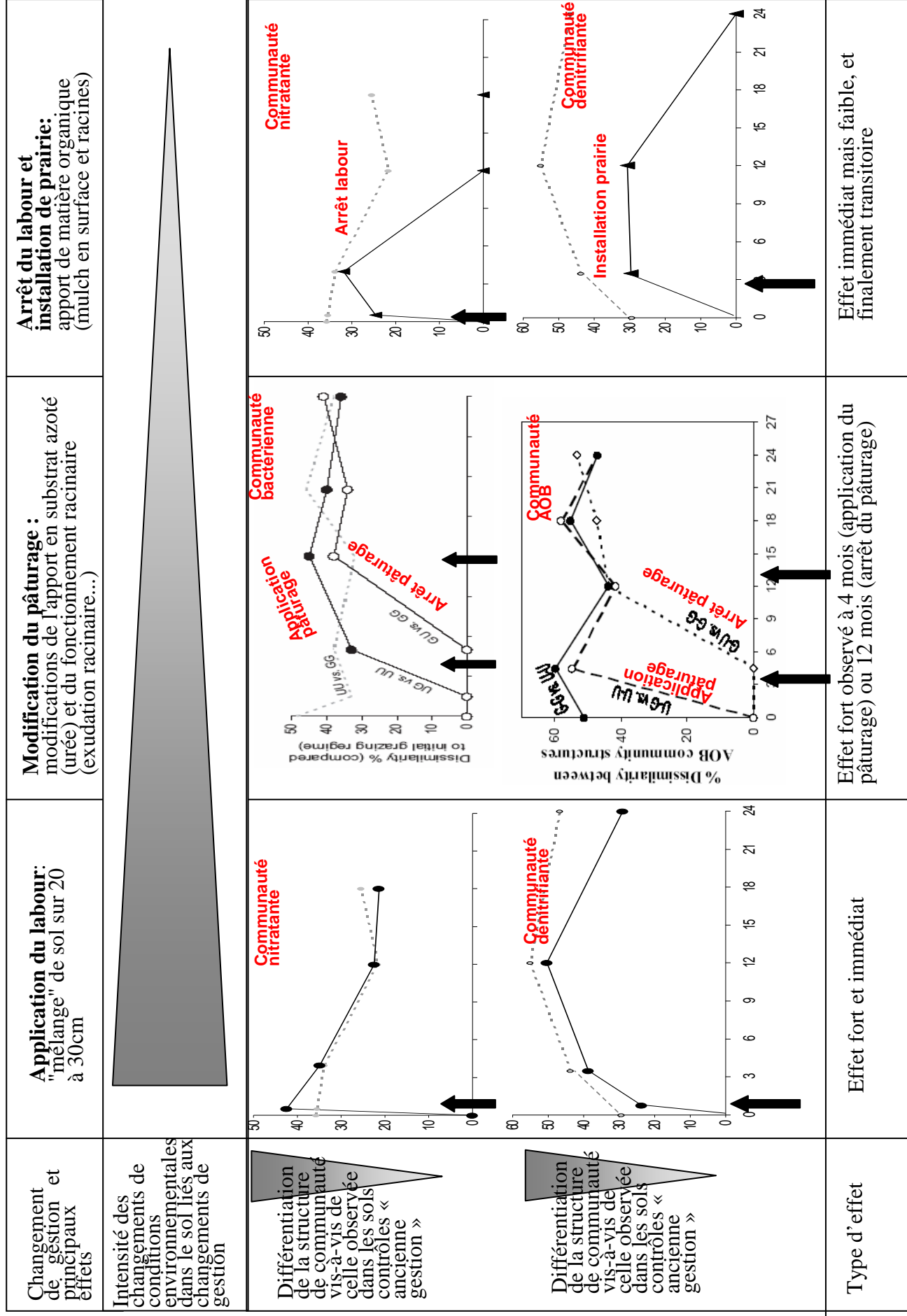
## **2. Synthèse et discussions des résultats**

### **2.1 Amplitude et temps de réponse des activités bactériennes du sol face aux changements de mode de gestion**

L'étude de plusieurs situations agronomiques nous a permis d'observer que la vitesse de réponse de l'activité nitrifiante dépendait surtout de l'intensité des modifications des conditions environnementales et de la disponibilité en substrats dans le sol causées par le changement de gestion : d'un effet probablement immédiat pour l'application du labour, à un effet détecté au bout de quelques mois à une année pour l'application et l'arrêt pâturage, jusqu'à un effet qui ne serait détecté qu'au bout de plusieurs années pour l'arrêt du labour (Fig. 1) :

- L'effet rapide et intense de l'application du labour sur l'activité nitrifiante provient du mélange de la couche de sol de surface qui présente une forte activité avec la couche de sol sous jacente qui a une faible activité.
- Les effets des modifications du pâturage sur l'activité nitrifiante se mettent en place plus lentement, en raison de modifications plus progressives de l'apport en substrat azoté (apports répétés d'urée) et du fonctionnement racinaire (notamment exsudation, en réponse aux défoliations répétées).





**Fig.2 :** Vitesse à laquelle les structures génétiques des communautés nitrifiantes et dénitrifiantes sont affectées après différents types de changement de gestion. La flèche noire (↑) indique quand un effet significatif commence à être observé. L'axe des x est un axe temps (en mois); l'axe y indique la dissimilarité entre la structure génétique de la communauté dans les sols ayant subi le changement de gestion, par rapport à celle dans les sols contrôles subissant l'ancien mode de gestion.

- Enfin, l'arrêt du labour ne modifie que très peu les conditions environnementales sur la durée de notre expérience, car il ne permet qu'une accumulation relativement lente et progressive de matière organique provenant de la biomasse aérienne végétale (création lente d'un mulch) et de la biomasse racinaire.

Les vitesses de réponse observées sont similaires pour l'activité dénitrifiante : une baisse drastique et immédiate après l'application du labour et le retournement de prairie, jusqu'à un effet détectable seulement après plusieurs années dans le cas de l'arrêt du labour et de l'implantation de prairie. On peut constater que l'application du labour sur un agrosystème et le retournement de prairie sur un autre agrosystème causent qualitativement les mêmes effets sur la dénitrification. Cette similarité de réponse de l'activité dénitrifiante provient d'une similarité de l'intensité des modifications des conditions environnementales et de la disponibilité en substrats causés par ces 2 changements de gestion : tous deux ont entraîné un mélange de couches de sol ayant des niveaux d'activité différents (effet mélange évoqué précédemment). De même, la similarité de réponse de l'activité dénitrifiante entre l'arrêt du labour et l'installation de prairie s'explique car il existe dans ces deux cas une modification lente des changements de conditions environnementales et de la disponibilité en substrats (matière organique surtout).

Concernant l'amplitude de la réponse de la communauté bactérienne nitrifiante, alors que l'application du labour et les modifications du pâturage ont très fortement modifié les activités nitrifiantes et nitrifiantes (mêmes valeurs que dans les sols subissant depuis toujours la nouvelle gestion), l'arrêt du labour n'a quasiment pas altéré le niveau de l'activité de nitrification (Fig. 1). Il est à noter que l'amplitude de l'activité dénitrifiante a également été très affectée par l'application du labour et quasiment pas par l'arrêt du labour (non présenté).

## **2.2 Amplitude et temps de réponse des structures génétiques des communautés bactériennes**

La figure 2 permet de synthétiser la vitesse à laquelle chaque type de changement de mode de gestion affecte la structure génétique de la communauté nitrifiante ou dénitrifiante dans les différents contextes agronomiques étudiés, en mesurant les pourcentages de dissimilarité entre les structures génétiques pour les communautés (i) des sols soumis aux changements de gestion et (ii) des sols contrôles correspondant à l'ancien mode de gestion.

<p>Changement de gestion et principaux effets</p>	<p>Application du labour: "mélange" de sol sur environ 20cm</p>	<p>Application du pâturage : modifications de l'apport en substrat azoté (urée)/et du fonctionnement racinaire (exudation racinaire...)</p>	<p>Arrêt du labour: apport de matière organique (mulch en surface et racines) Arrêt du pâturage: modification substrat azoté et fonctionnement racinaire</p>
<p>Intensité des changements de conditions environnementales dans le sol liés aux changements de gestion</p>			
<p>Différentiation de la structure de communauté vis-à-vis de celle observée dans les sols contrôles «nouvelle gestion »</p>	<p>Communauté nitrifiante</p>	<p>Communauté AOB</p>	<p>Communauté nitrifiante</p>
<p>Temps pour que la nouvelle gestion pilote la structure</p>	<p>&lt;4 mois</p>	<p>&lt;2ans</p>	<p>&gt;2 ans</p>

**Fig. 3 :** Vitesse à laquelle le nouveau mode de gestion pilote la structure génétique de la communauté nitrifiante après différents types de changement de gestion. La flèche (↑) indique quand la structure de communauté est essentiellement pilotée par la nouvelle gestion. L'axe des x est un axe temps (en mois); l'axe y indique la dissimilarité entre la structure génétique de la communauté dans les sols ayant subi le changement de gestion, par rapport à celle dans les sols contrôles subissant le nouveau mode de gestion.

Plus ce pourcentage de dissimilarité est élevé, plus l'effet du nouveau mode de gestion sur la structure génétique de la communauté est important. On peut donc observer que, quelque soit la communauté et le type de changement de gestion, toutes les structures génétiques sont affectées peu de temps après les changements de gestion (de quelques semaines à quelques mois ; cf Fig. 2).

Quantitativement, certains changements de gestion tels que l'application du labour et le retournement de prairie ont un effet plus prononcé sur les structures génétiques des communautés nitrifiantes et dénitrifiantes que d'autres changements de gestion tels que l'arrêt du labour et l'implantation de prairie (Fig. 2). Par ailleurs, l'arrêt du labour et l'implantation de prairie ont non seulement des effets de plus faible amplitude sur les structures de communautés, mais n'ont pas des effets permanents sur la structure génétique des dénitrifiants (Fig. 2).

La figure 3 permet d'observer au bout de combien de temps après chaque type de changement de mode de gestion, la structure génétique de la communauté bactérienne peut s'expliquer essentiellement par le nouveau mode de gestion. Ceci est évalué en mesurant les pourcentages de dissimilarité entre les structures génétiques des communautés pour (i) les sols soumis aux changements de gestion et (ii) les sols contrôles correspondant au nouveau mode de gestion. Ici, plus le pourcentage de dissimilarité est élevé, moins la structure génétique de la communauté ressemble à celle correspondant à la nouvelle gestion ; à l'inverse, plus le pourcentage de dissimilarité est faible, plus la structure génétique de la communauté est pilotée par la nouvelle gestion, indépendamment des modes de gestion passés. On peut observer qu'après l'application du labour, la communauté nitrifiante est immédiatement pilotée par la nouvelle gestion, alors qu'il faut attendre 2 années pour observer le même résultat après l'application du pâturage, et probablement plusieurs années pour l'arrêt du labour et l'arrêt du pâturage. A titre de comparaison, après l'établissement d'une culture sur des sols prairiaux, la structure génétique de la communauté des *Burkholderia* est pilotée par la nouvelle gestion après 4 années ; alors qu'au bout de 4 ans, la structure de cette communauté dépend encore à la fois des modes de gestion passé et présent dans le cas de la conversion inverse (culture en prairie)(Salles et al., 2006a).

Contrairement au cas de la communauté nitrifiante, les structures génétiques des communautés bactérienne et dénitrifiante n'atteignent jamais un état similaire à celui observé dans les sols contrôle soumis à la nouvelle gestion. Sachant que ces structures génétiques sont également différentes de celles observées pour les sols contrôles soumis à l'ancienne gestion,

**Tableau 1** : Rappels des corrélations observées (cf chapitres 3 et 4) entre les changements d'activités enzymatiques (haut) de dénitrification et (bas) de nitratation, et la structure génétique de la communauté bactérienne associée (i.e. respectivement communauté réductrice de nitrite et oxydant le nitrite). Ceci montre que les corrélations entre activité et structure de communauté sont soit non significatives soit significatives mais faibles.

#### Communauté dénitrifiante

Lusignan (conversion prairie/culture)		Boigneville (application/arrêt labour)	
Temps (mois)	$\rho$ valeurs p	Temps (mois)	$\rho$ valeurs p
3.5	0.27 <b>0.02</b>	0.5	0.35 <b>0.02</b>
12	0.65 <b>0.001</b>	3.5	-0.01 0.51
ND	ND ND	12	0.04 0.32
24	0.18 0.13	17	-0.02 0.91

#### Communauté nitratante de type *Nitrobacter*

Temps (mois)	$\rho$ valeurs p	Temps (mois)	$\rho$ valeurs p
0	0.36 <b>0.002</b>		
0.5	0.68 <b>0.001</b>		
3.5	- NS		
11	0.25 <b>0.044</b>		
17	- NS		
Total	0.139 <b>0.001</b>		

ces communautés se retrouvent donc dans un état qui dépend à la fois de l'ancienne et la nouvelle gestions. Ceci est également retrouvé par d'autres auteurs sur des durées encore plus longues après changement de mode de gestion (4 et 7 années d'abandon de l'agriculture, (Buckley and Schmidt, 2001; Salles et al., 2006a).

**En résumé, la vitesse et l'amplitude avec lesquelles les activités et structures des communautés étudiées sont affectées par des changements de mode de gestion dépendent du type de changement de gestion. Les changements de gestion entraînant des modifications plus intenses et rapides des conditions environnementales et disponibilité en substrats (par exemple labour de sols initialement en semis direct) ont globalement un effet plus marqué et plus rapide que les changements inverses (par exemple, arrêt du labour) sur l'activité et la structure génétique de la communauté considérée.**

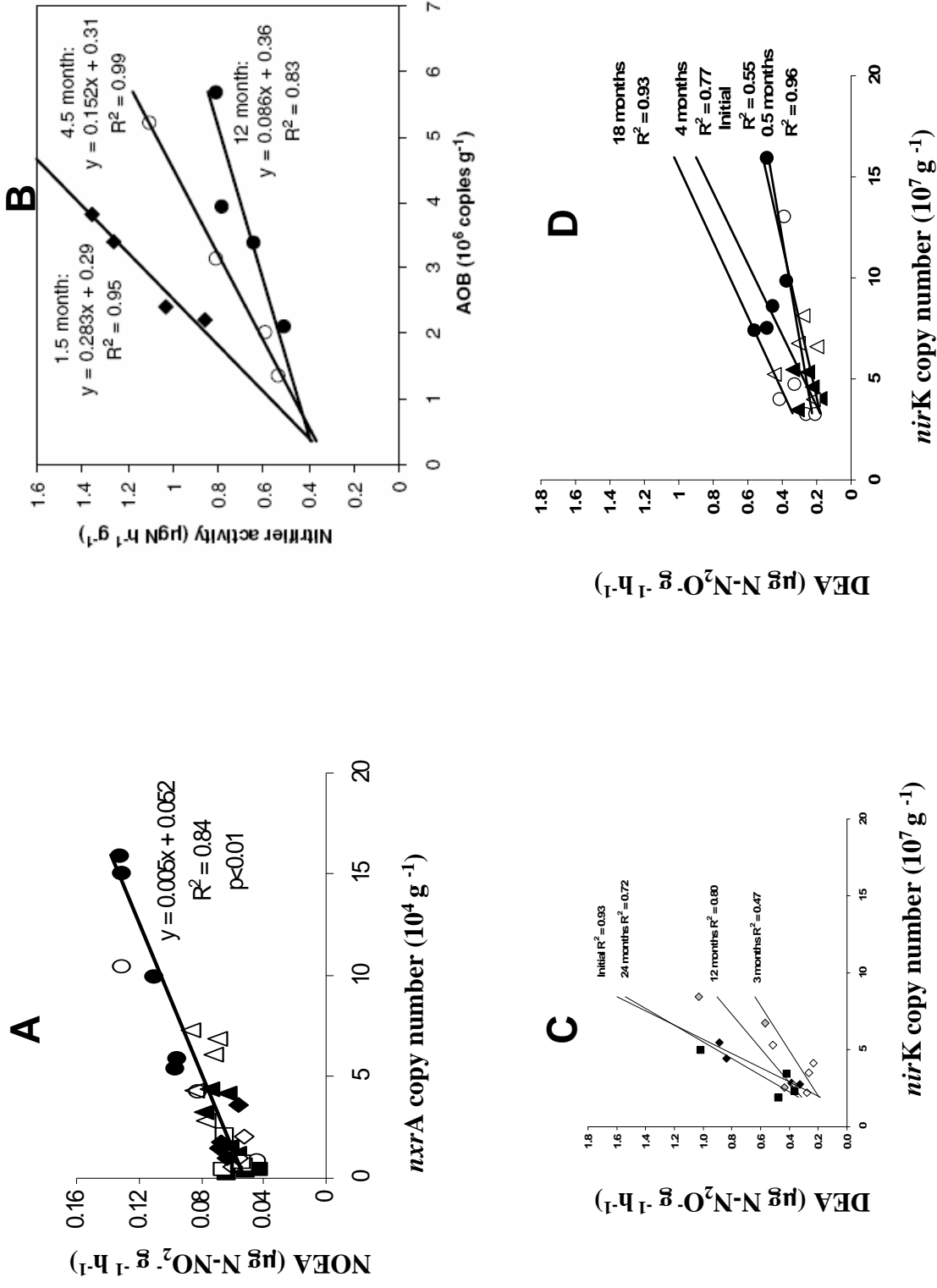
**Sur la durée de nos expériences, seule la structure génétique des nitrifiants finit par être déterminée par la nouvelle gestion, possiblement en raison de la plus faible diversité de cette communauté. Dans les autres situations, la structure génétique reste différente à la fois de celle caractéristique de l'ancienne gestion et de celle caractéristique de la nouvelle gestion.**

### **2.3. Quelles relations entre changements d'activités et changements de structure génétique et/ou d'effectifs ?**

#### **2.3.1 Un lien faible entre changements d'activités et de structures génétiques**

Les changements du niveau d'une activité bactérienne donnée peuvent provenir entre autre d'un changement dans la composition de la communauté correspondante puisque l'activité spécifique (activité par cellule) peut varier selon les espèces bactériennes. Etudier les corrélations entre les changements d'activité et de structure génétique de la communauté correspondante permet de déterminer dans quelle mesure les changements de composition peuvent être impliqués dans les changements d'activité.

Dans ce travail, nous avons montré que les corrélations entre activité et structures génétiques des communautés nitrifiantes et dénitrifiantes sont parfois significatives (mais dans ce cas souvent faibles) voire non significatives (Tab. 1). La structure génétique de la communauté, évaluée par des techniques de « fingerprint » sur des séquences d'ADN,



**Fig. 4 :** Rappel des corrélations observées entre les changements d'activités enzymatiques et les effectifs de la communauté bactérienne associée. A: activité nitrifiante en fonction des effectifs de bactéries nitrifiantes de type *Nitrobacter* (chapitre 3); B: activité nitrifiante en fonction des effectifs de bactéries nitrifiantes (annexe 2); C: activité dénitrifiante en fonction des effectifs de bactéries dénitrifiantes (chapitre 4; site de Lusignan); D: activité dénitrifiante en fonction des effectifs de bactéries dénitrifiantes (chapitre 4; site de Boigneville). Ceci montre que les corrélations entre activité et effectif sont toujours significatives, parfois très fortes, avec ou sans effet temps apparent.

n'explique donc que partiellement voire pas du tout les changements d'activité. En effet, même chez des communautés considérées comme peu diverses taxonomiquement comme la communauté nitrifiante, des phénomènes de redondance fonctionnelle peuvent être observés. Alors, des communautés différentes (en terme de composition spécifique) peuvent réaliser un même niveau d'activité. Ce haut niveau de redondance fonctionnelle chez les communautés bactériennes a déjà été rapporté par Wertz et al. (2006). Ces auteurs ont observé qu'une érosion, même sévère, de la diversité des communautés nitrifiantes et dénitrifiantes, n'altérerait pas ou très peu leur fonctionnement (en terme de capacité à réaliser la nitrification et la dénitrification).

Donc, pour expliquer les changements de niveaux d'activité de la communauté nitrifiante ou dénitrifiante après les changements de gestion, il faut prendre en compte d'autres facteurs que la seule structure génétique de la communauté.

### **2.3.2 Un lien plus fort entre changements d'activités et d'effectifs**

Les changements de niveaux d'une activité bactérienne peuvent également provenir d'un changement de l'abondance des bactéries appartenant à la communauté fonctionnelle correspondante. Pour la communauté nitrifiante, les changements d'effectifs ont expliqué plus de 80% des changements d'activité, la relation observée étant valide pour tous les traitements et toutes les dates (c'est-à-dire qu'à un niveau d'effectif correspond toujours un niveau d'activité, quelles que soient les conditions et la date considérées) (Fig. 4). Ceci démontre que l'activité nitrifiante est principalement modulée par les effectifs de bactéries nitrifiantes qui apparaît être la variable de contrôle proximale de l'activité, sans effet d'autres variables ou avec effet d'autres variables mais qui agiraient alors en tant que variables distales via leur effet sur l'effectif (voir plus loin).

Par contre, pour les corrélations entre les effectifs des dénitrifiants et la dénitrification, des relations significatives et faibles ont été observées, mais avec un effet temps ou traitement : à un effectif donné, différents niveaux d'activités peuvent être observés (Fig. 4). Pour cette communauté, on peut supposer qu'interviennent les effets de variables environnementales (température, humidité...) et de disponibilité en substrat (nitrate, carbone organique...) qui vont affecter l'activité spécifique (activité par cellule) au fil du temps. Dans ce cas, les effectifs et surtout la structure génétique de la communauté ont une importance beaucoup plus faible pour expliquer les variations de l'activité dénitrifiante que dans le cas de la communauté nitrifiante : comprendre et prédire les niveaux de dénitrification nécessite donc





de prendre en compte à la fois effectifs et variables environnementales et disponibilité en substrats.

Pour les 2 communautés nitrifiantes et surtout dénitrifiantes, nous avons alors souhaité déterminer l'importance non seulement de l'effectif mais aussi des modifications des variables environnementales et de disponibilité en substrats pour la réponse des activités bactériennes correspondantes après les changements de mode de gestion. Pour affiner notre compréhension de la réponse de l'activité dénitrifiante, nous avons quantifié et hiérarchisé les effets des différentes variables grâce à une analyse par GLM (General Linear Model).

#### **2.4 Quelles relations entre changements d'activités et changements de variables environnementales et de disponibilité en substrat**

D'après les résultats de GLM, la dénitrification s'avère être déterminée principalement par le carbone organique, ce dernier agissant directement en tant que substrat pour les dénitrifiants et indirectement via une modification des effectifs et de l'humidité (un sol plus riche en matière organique aura une meilleure capacité de rétention d'eau). L'humidité intervient également directement sur les modifications de l'activité, procurant les conditions d'anaérobiose nécessaires à la réalisation de la dénitrification. Concernant le substrat azoté, son importance apparaît beaucoup plus forte pour expliquer les changements de l'activité nitrifiante que de l'activité dénitrifiante. Pour la communauté nitrifiante du type *Nitrobacter*, nous avons pu évaluer la disponibilité en azote grâce au flux brut de minéralisation (voir discussion dans l'article présenté dans le chapitre 3). Par contre, pour la communauté dénitrifiante, n'ayant pas pu mesurer le flux de nitrification brut, nous avons mesuré le pool de nitrate qui est la résultante de plusieurs processus. Cette différence dans l'estimation de la disponibilité en substrat azoté pourrait expliquer partiellement que l'effet de la disponibilité en substrat azoté apparaisse plus fort pour l'activité nitrifiante que pour l'activité dénitrifiante. Cependant, la faible corrélation que nous avons observée entre les modifications de concentrations en nitrate dans le sol et l'activité de dénitrification est rapportée dans d'autres études (par exemple Barnard et al., 2006) ; une autre hypothèse peut donc être privilégiée. En effet, l'oxydation de l'ammonium et du nitrite par les communautés nitrifiante et nitrifiante correspond à une activité de base, obligatoire pour ces bactéries qui tirent leur énergie et leur capacité de croissance de ces activités (bien que certains nitrifiants



puissent être actifs en conditions mixotrophes ou hétérotrophes<sup>1</sup>). Il est donc logique en ce cas que l'effectif et le pool enzymatique clé de chacune de ces communautés soient fortement liés à la disponibilité en ammonium et nitrite dans les sols. A l'inverse, la réduction du nitrite par les bactéries dénitrifiantes correspond à une activité facultative et inductible ; hormis celles vivant en permanence dans des micro-environnements où la pression partielle d'oxygène est faible, la plupart des bactéries dénitrifiantes présentes dans un sol fonctionnent en routine comme des hétérotrophes 'classiques' et tirent leur énergie d'une respiration aérobie notamment, ne basculant sur une respiration anaérobie telle que la dénitrification que lorsque que l'oxygène vient à manquer et en présence de nitrate (Tiedje, 1983). Dans ce dernier cas, le nitrate remplace alors l'oxygène et joue le rôle d'accepteur d'électrons. Il n'est donc pas surprenant en ce cas que l'effectif et le pool enzymatique clé de la communauté dénitrifiante ne soient au final pas fortement liés à la disponibilité en nitrate dans les sols, d'autres variables contrôlant leur activité et leur croissance en tant qu'hétérotrophes (carbone organique notamment) pouvant s'avérer très importants. Ceci sera encore plus vrai si le nitrate nécessaire à la dénitrification est ajouté régulièrement aux sols de culture étudiés, et si d'une manière générale le nitrate n'est pas un facteur limitant pour la dénitrification.

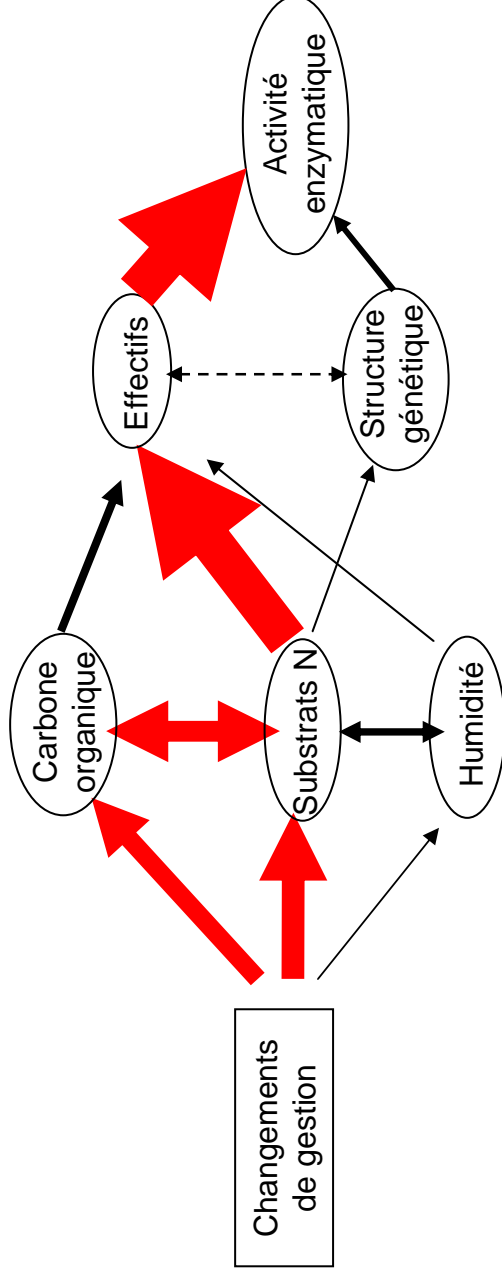
## **2.5 Synthèse des principales variables déterminant les activités bactériennes**

La figure 5, « synthétise » les principaux mécanismes par lesquels les différents changements de gestion étudiés déterminent la réponse observée sur l'activité de la communauté nitrifiante (en haut) et de la communauté dénitrifiante (en bas). Nous avons construit cette figure en prenant en compte les résultats présentés dans les chapitres 3, 4 et 5 de cette thèse, et les différentes conclusions rappelées ci-dessus. On peut tout d'abord noter le relativement faible pouvoir explicatif de la structure génétique sur les variations de chaque activité étudiée. Bien que les modifications de structure génétique de la communauté bactérienne après changement de mode de gestion soient à chaque fois fortes, elles n'apparaissent pas comme un facteur déterminant qui pourrait expliquer les modifications d'activités bactériennes après les changements de mode de gestion (Fig. 5).

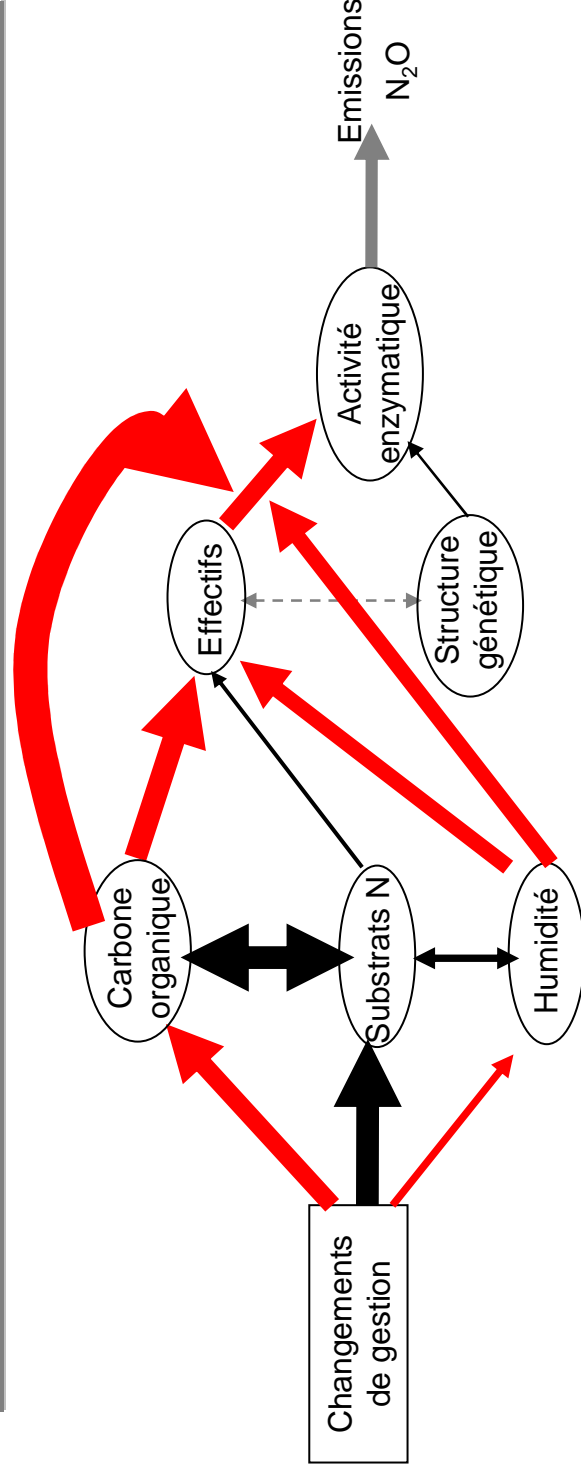
---

<sup>1</sup> Il faut cependant bien noter pour les nitrifiants que certains genres sont capables de croître en hétérotrophie, donc, sans réaliser l'oxydation du nitrite en nitrate. Cependant, dans les sols, ces bactéries aux très faibles taux de croissance sont généralement considérées comme de bien faibles compétiteurs des sources de carbone organique face aux bactéries hétérotrophes. Malgré l'absence de données quantifiant ce phénomène d'hétérotrophie pour les nitrifiants dans les conditions naturelles, on peut donc supposer que ces bactéries se retrouvent majoritairement dans des contextes d'autotrophie et de mixotrophie avec une activité nitrifiante obligatoire.

## Activité du métabolisme de base pour les bactéries: cas de la nitratisation



## Activité facultative pour les bactéries: cas de la dénitrification



**Fig. 5 :** Synthèse des corrélations observées par GLM et path-analysis entre variables mesurées (plus une flèche est large, plus la corrélation est forte); et interprétation en terme de mécanismes clés (flèches en rouge) expliquant les effets des changements de mode de gestion sur l'activité de la communauté nitrifiante et dénitrifiante. (haut) La nitrification est essentiellement liée aux effectifs de nitrifiants, eux-mêmes dépendant fortement de la disponibilité en substrats azotés. (bas) La dénitrification est certes liée aux effectifs de dénitrifiants, eux-mêmes dépendant de la disponibilité en carbone organique et du régime hydrique; mais à effectif donné, la dénitrification est modulée (variation de l'activité spécifique) par la disponibilité en carbone organique et du régime hydrique.

Au-delà de ce point commun aux 2 communautés bactériennes, les mécanismes par lesquels les changements de gestion déterminent la réponse de l'activité apparaissent assez différents entre la communauté nitratante et la communauté dénitrifiante. En résumé, nous avons observé que, pour la communauté nitratante, les modifications d'effectifs, qui dépendent elles mêmes des modifications de la disponibilité du substrat azoté, étaient déterminantes pour expliquer les changements d'activité (Fig. 5). De manière très différente, les modifications de la teneur en carbone organique, de l'humidité du sol puis des effectifs bactériens seront, dans ce cas, des facteurs clés pour expliquer les changements de l'activité dénitrifiante. La teneur en carbone organique a ici d'une part un effet sur les effectifs des bactéries dénitrifiantes qui eux-mêmes influencent l'activité, et d'autre part un effet sur l'activité spécifique des dénitrifiants (Fig. 5). Ces différences s'expliquent comme nous l'avons dit par le fait que pour les nitrifiants, l'activité d'oxydation de l'ammonium ou du nitrite correspond à leur métabolisme de base, rendant la réalisation de cette activité obligatoire à leur croissance/maintien, ce qui débouche sur un lien très fort entre disponibilité en substrat azoté, effectif et activité pour ce type de communauté ; à l'inverse, la dénitrification est une activité facultative, ce qui explique la plus grande complexité des déterminants de la dénitrification et le plus grand découplage existant entre dénitrification et disponibilité en substrats azoté pour les dénitrifiants.

Se basant sur ces résultats et cette interprétation, on peut conclure que les effectifs et la disponibilité en substrats seront en lien fort avec la réalisation d'une activité bactérienne à caractère « obligatoire ». A l'opposé, pour une communauté dont on considérera une activité facultative (i.e. qui peut alterner avec la réalisation d'une autre activité), les changements d'activité seront plus complexes, et pilotés par les modifications des variables environnementales déterminant non seulement l'activité cible, mais aussi les autres activités importantes pour le métabolisme des bactéries étudiées et qui se traduisent *in fine* en terme de croissance et donc d'effectifs et de pool enzymatique de la communauté.

**En conclusion, étudier en parallèle différentes communautés bactériennes nous a permis de mettre en avant (i) le faible pouvoir explicatif de la structure génétique pour les variations d'activité suite aux changements de gestion, (ii) l'importance des modifications des effectifs en lien avec la disponibilité en substrat d'une communauté**



**réalisant une activité de son métabolisme de base, et (iii) la plus faible importance des modifications des effectifs et la plus grande complexité des déterminants environnementaux au sens large pour une communauté réalisant une activité facultative.**

**Ces résultats peuvent fournir des bases pour mieux prendre en compte la composante microbienne dans des modèles de la dynamique du C et de l’N dans les sols.**

### **3. Limites de notre étude**

A posteriori, j’ai identifié 3 limites méthodologiques et 2 limites dues à la stratégie d’échantillonnage pour mon travail de thèse.

#### ***Analyses de la structure des communautés en ciblant des séquences au niveau ADN***

Pour étudier les structures génétiques des différentes communautés, nous avons utilisé des méthodes dites de « fingerprint » en amplifiant des séquences cibles de l’ADN bactérien. Or, étudier une structure de communauté au niveau de son ADN ne reflète pas la structure des bactéries réellement actives dans les sols ; en effet, les bactéries en dormance, ou mortes récemment, ou plus généralement ne réalisant pas la fonction considérée au moment du prélèvement, seront prises en compte au même titre que les bactéries actives. Pour éviter cela, il aurait fallu se tourner vers d’autres techniques telles que celles portant sur le niveau des ARNm (par exemple Wallenstein et Vilgalys, 2005) qui auraient alors permis la prise en compte des seules bactéries métaboliquement actives ; ou telle que la SIP (Stable Isotope Probing (Radajewski et al., 2000) qui aurait pu déterminer quels dénitrifiants incorporent efficacement des sources de carbone organique marquées. Mais ce sont toutes deux des techniques lourdes à mettre en œuvre et pas toujours mises au point pour les gènes de fonction qui nous intéressaient (notamment la SIP). Ces techniques nous auraient permis d’obtenir des informations complémentaires mais cela aurait eu aussi pour conséquence de limiter drastiquement le nombre d’échantillons étudiés. Malgré la limite que nous venons de souligner, étudier des fingerprints au niveau ADN nous a permis de traiter un grand nombre d’échantillons, sans lesquels nous n’aurions pas pu caractériser si finement la cinétique de réponse des communautés. Plus encore, nous avons toujours observé des réponses rapides de la structure de communauté, ce qui souligne que cette structure est très dynamique même





lorsqu'on se place au niveau ADN, et que l'approche adoptée limite sans doute peu notre capacité à caractériser les temps de réponse de la structure de communauté. On peut par contre penser que l'approche adoptée limite sans doute plus notre capacité à rechercher des corrélations entre activité et structure de communauté.

### ***Sélection de certains des gènes impliqués dans une fonction bactérienne***

Pour étudier la communauté dénitrifiante (effectif et structure génétique), nous avons ciblé le gène *NirK* et pas les nombreux autres gènes impliqués dans cette fonction (Philippot, 2002), et notamment le gène *NirS* qui est porté par d'autres bactéries mais qui code une enzyme réalisant la même étape de la dénitrification que celle codée par *nirK* (seul le site actif diffère, étant un site respectivement à cuivre et à cadmium). Cependant, d'autres études réalisées au sein du laboratoire (en cours de valorisation) et au laboratoire de Microbiologie de Dijon (L. Philippot, comm pers) tendent à montrer que (1) les effectifs des bactéries porteuses du gène *nirS* sont proches de ceux des bactéries porteuses du gène *nirK* dans différents sols cultivés, et (2) les effectifs des bactéries dénitrifiantes évalués soit par *NirS* soit par *NirK* sont corrélés. Nous aurions également pu nous focaliser sur le gène *NosZ* (Henry et al., 2006) pour étudier la communauté bactérienne à l'origine de la réduction du N<sub>2</sub>O en N<sub>2</sub>. Mais notre mesure d'activité de dénitrification (DEA) ne prend pas en compte l'étape de réduction du N<sub>2</sub>O et il était donc pertinent de ne pas cibler le gène *NosZ*.

Pour la communauté nitrifiante, avec nos amorces *NxrA* nous avons pris en compte les nitrifiants de type *Nitrobacter* sans pouvoir accéder aux nitrifiants de type *Nitrospira*. Mais il ne s'agissait pas ici d'un choix, mais d'une contrainte méthodologique car actuellement aucun outil adéquat de qPCR et de fingerprint n'est disponible pour ce genre bactérien.

### ***Limites des mesures d'activités bactériennes potentielles et réelles***

Pour évaluer les différentes activités bactériennes, nous avons mesuré des activités potentielles et non pas des activités réelles. Notre mesure nous a donné une évaluation du pool d'enzymes pour une activité donnée, donc, la capacité du sol à réaliser cette activité (dans des conditions optimales). Mais cela ne permet pas de mesurer le niveau des flux de nitrification ou de dénitrification se déroulant réellement dans les sols. Pour la nitrification, nous avons essayé de mesurer à quelques dates, via la technique des flux bruts avec apport de <sup>15</sup>NO<sub>3</sub>, la nitrification brute. Cette mesure s'est malheureusement révélée infructueuse à cause de problèmes techniques associés à la méthode de dilution du pool de <sup>15</sup>NO<sub>3</sub>. Pour la dénitrification, mesurer cette activité telle qu'elle se passe réellement sur le terrain implique



un suivi extrêmement lourd des émissions de N<sub>2</sub>O par le sol, ce qui n'était pas possible dans le cadre de ma thèse. Nous avons fait le choix de nous tourner préférentiellement vers les mesures d'activités potentielles de dénitrification plutôt que vers la mesure des émissions *in situ* de N<sub>2</sub>O, cette dernière étant très dépendante des conditions climatiques (par exemple, pics de N<sub>2</sub>O après des évènements pluvieux) et représentant donc une grande part de réponse sous contrôle abiotique par rapport à la réponse sous contrôle biotique.

### ***Limites dues à notre stratégie d'échantillonnage***

A posteriori, pour les expérimentations faites à Lusignan et Boigneville, je pense qu'il aurait été intéressant de faire un prélèvement juste après les changements de mode de gestion (un à quelques jours) pour mieux pouvoir conclure sur les effets du mélange des couches de sol (par le retournement de prairie) sur les caractéristiques bactériennes. A ce moment-là, il aurait été intéressant de réaliser un prélèvement non seulement pour la couche de surface mais aussi plus en profondeur (10-20 cm) afin de vérifier cette hypothèse sur ce site. Mais avoir ainsi deux prélèvements successifs à quelques jours d'intervalle s'est avéré impossible d'un point de vue pratique (il faut plus que quelques jours pour faire toutes les mesures d'activités et de flux sur les échantillons d'une date de prélèvement...).

## **4. Perspectives**

### **4.1. Futurs compléments à l'étude**

#### ***Poursuite de l'expérimentation à Lusignan***

Tout d'abord, étant donné l'absence d'effet de l'établissement de la prairie (CP) sur la majorité des caractéristiques bactériennes sur une durée de 2 ans, l'approche expérimentale sur le long terme adoptée par l'ORE à laquelle notre étude s'est adossée permettra, au prochain prélèvement prévu en 2011 (n+6 ans) d'observer si le changement de gestion (culture vers prairie) présente finalement des effets très significatifs sur la dénitrification notamment.

#### ***Compléter les données de dénitrification potentielle avec les émissions de N<sub>2</sub>O***

En complément de la mesure de dénitrification potentielle, il serait intéressant d'obtenir des mesures de flux d'émissions de N<sub>2</sub>O pour pouvoir extrapoler les données de dénitrification potentielle aux émissions réelles de ce fort gaz à effet de serre. Dans ce cas-là,



il faudrait alors également étudier la réponse de la communauté réductrice du N<sub>2</sub>O en ciblant le gène *NosZ* plutôt que *NirK*. Pour cette étude, nous n'avons pas fait ce choix car les mesures de ce flux sont très variables, très dépendantes des conditions climatiques et il n'était pas possible non plus d'augmenter le nombre de variables suivies. Mais, à moyen terme, ce type de mesure (actuellement en cours sur les 2 sites) pourrait permettre de dresser un bilan de ce gaz à effet de serre (en plus des données d'émissions de CO<sub>2</sub> déjà acquises sur certains traitements des sites Lusignan et Boigneville) et donc de conclure quant aux effets bénéfiques ou non de l'installation de prairie et de semis direct en matière de gaz à effet de serre.

#### **4.2. Eléments « supplémentaires »**

##### ***Préciser la caractérisation du cycle de l'azote par une mesure de flux brut réel de nitrification***

Un prochain prélèvement de sol, serait l'occasion de revoir les conditions expérimentales (temps d'incubation, niveau de marquage...) nécessaire pour la mesure du flux de nitrification brute sur les sols étudiés : sachant que cette activité présente un rendement plus faible que la minéralisation de l'azote par exemple, nous pourrions adapter la méthode pour obtenir une sensibilité plus grande et être en mesure de quantifier des flux mêmes faibles. Ceci nous permettrait de comparer le flux brut de nitrification (non potentiel) et l'activité potentielle de nitrification et également de mieux estimer le flux de nitrate pour les dénitrifiants.

##### ***Compléter l'analyse de la réponse des nitratants aux changements de mode de travail du sol sur le site de Boigneville***

Dans le contexte de changements de modes de labour, nous avons pu mettre en évidence, par clonage-séquençage et par analyse des données DGGE, la sélection d'une population spécifique aux sols en semis direct. Une perspective de ce résultat pourrait donc être la définition d'amorces spécifiques de cette séquence particulière afin d'avoir un suivi précis dans le temps et dans l'espace de cette population nitratante qui semble fortement sélectionnée en semis direct.

Plus globalement, notre étude de l'activité nitratante et de la communauté nitratante de type *Nitrobacter* pourrait être affinée avec l'étude des nitratants du type *Nitrospira*. Cela permettrait de confirmer ou non que les *Nitrobacter*, souvent considérés comme des stratèges de type r parmi les nitratants (Schramm et al., 1999), pilotent l'activité de nitrification dans les



conditions de plus forte disponibilité en azote, alors que les *Nitrospira*, souvent considérés comme des stratèges K, seraient fonctionnellement plus importants dans les conditions de faible disponibilité en azote.

### ***Découpler les effets des différentes variables clés de la réponse des activités bactériennes après les changements de mode de gestion***

Des études menées en microcosmes autorisant un contrôle strict des conditions environnementales pourraient permettre d'aller plus loin dans l'identification et la hiérarchisation des variables clés de la réponse des activités bactériennes.

Pour la communauté nitratante, il serait ainsi intéressant de revoir l'expérience tentée au cours de cette thèse (chapitre 3) dont le but était de découpler les effets du carbone organique ou du nitrite sur l'activité nitratante. Un suivi du flux de minéralisation brute permettrait de voir dans quelle mesure l'apport de carbone organique peut améliorer la disponibilité en azote *via* une augmentation de la minéralisation de l'azote.

Pour la communauté dénitrifiante, une étude en microcosme pourrait permettre de décorréler les effets du carbone organique et de l'humidité (*via* ses effets sur l'anaérobiose). Il serait possible de créer artificiellement des conditions d'anaérobiose en remplaçant l'O<sub>2</sub> ambiant par de l'Hélium, et surtout de préciser les effets du carbone organique sur l'activité dénitrifiante en apportant du carbone organique de deux manières différentes : (1) en couche uniforme, simulant/caricaturant une situation de sols non labourés telles que les prairies ou les sols de semis direct, ou (2) de manière homogène, simulant/caricaturant une situation de sols labourés. On pourrait alors suivre spatialement les effets de ces apports en utilisant notamment des mesures de flux bruts à micro-échelle (Cliff et al, 2006). Par ailleurs, ce carbone organique pourrait être marqué afin de discriminer les bactéries assimilant activement le carbone marqué des bactéries n'assimilant pas ce carbone marqué grâce à la technique SIP (Radajewski et al., 2000). De plus, une étude en microcosme permettrait de réduire les biais des mesures d'émissions de N<sub>2</sub>O et donc de pouvoir aller jusqu'à la détermination de bilan de GES.

### **4.3. Implications de nos conclusions pour la modélisation**

Dans la littérature, plusieurs modèles ont inclus les activités de nitrification et dénitrification dans leurs simulations. Par exemple, on peut citer les études de Henault et al. (2005) et Gabrielle et al. (2006) qui ont intégré le processus de dénitrification dans des modèles simulant les émissions de N<sub>2</sub>O, les études de Laville et al. (2005) et de Garnier et al.





(2003) qui ont intégré le processus de nitrification dans des modèles simulant les émissions de N<sub>2</sub>O et les transformations de C et N. Cependant, la plupart de ces modèles représentent les transformations de l'azote généralement avec des cinétiques d'ordre zéro ou premier ordre ou des réponses de type Michaelis-Menten, prenant en compte la disponibilité du substrat, et les fonctions environnementales qui affectent les vitesses des processus. Peu de modèles prennent en compte explicitement des caractéristiques des communautés bactériennes, par exemple avec un taux de croissance d'une population microbienne (Acutis et al., 2000; Li, 2000; Garnier et al., 2003)

A partir de notre synthèse sur les effets des changements de gestion sur les variables chimiques et bactériennes, nous avons pu montrer l'importance des variables telles que les effectifs de *Nitrobacter*-like NOB, la disponibilité en azote et la teneur en carbone organique total du sol et, dans une moindre mesure, l'humidité et les effectifs des dénitrifiants pour expliquer les potentiels enzymatiques de nitrification et dénitrification. Ces données pourraient donc être valorisées dans des modèles prenant en compte explicitement la composante microbienne, notamment en utilisant l'activité enzymatique potentielle, AE (voir équations ci-dessous).

Par contre, il n'est pas envisageable d'intégrer les données de diversités génétiques car actuellement, cette variable n'est pas celle qui rend le mieux compte du fonctionnement du système en raison d'une part des difficultés méthodologiques et d'autre part de la redondance fonctionnelle rencontrée. Pourtant, de très nombreuses études d'écologie microbienne ont consacré énormément de temps, d'argent et d'énergie à déterminer très finement la structure génétique de diverses communautés avec des outils taxonomiques. Au vu de la synthèse de nos résultats sur plusieurs sites et communautés, on peut se demander comment intégrer aisément et de manière fiable de tels résultats de diversité taxonomique dans des problématiques de fonctionnement des écosystèmes. Une telle affirmation ne signifie pas pour autant que toute donnée de diversité génétique est inutile puisque comme nous l'avons vu sur la communauté NOB, prendre en compte le rapport d'effectifs (donc de diversité des NOB) entre les genres *Nitrospira* et *Nitrobacter* pourraient suffire à expliquer les changements d'activité. Cependant, de manière plus générale, on peut considérer que la caractérisation actuelle de la diversité taxonomique n'apporte pas les éléments suffisants pour comprendre et modéliser le fonctionnement de l'écosystème.

Plus précisément, au vu de nos résultats synthétisés dans la figure 5, nous proposons de décrire les activités enzymatiques (AE) selon 2 équations prenant en compte les effectifs et



la disponibilité en azote minéral pour la communauté nitrifiante et les effectifs modulés par la disponibilité en carbone organique et les conditions d'anaérobiose (via l'humidité) pour la communauté dénitrifiante.

**Pour la communauté nitrifiante :**

$$AE = a \text{ Eff} + b$$

$$\text{Avec Eff} = c \text{ Min} + d$$

**Pour la communauté dénitrifiante :**

Sur le court terme et prenant donc en compte les phénomènes d'induction de la dénitrification par les conditions d'anaérobiose et de disponibilité en carbone organique

$$AE = (a \text{ Eff} + b) f(\text{C}_{\text{tot}}; \theta)$$

$$\text{Avec } 0 < f < 1$$

Sur le long terme :

$$\text{Eff} = g(\text{C}_{\text{tot}}; \theta)$$

Avec, AE l'activité enzymatique, Eff, l'effectif de la communauté, Min la minéralisation brute de l'azote, C<sub>tot</sub>, la teneur en carbone organique total,  $\theta$ , le pourcentage de la porosité du sol remplie d'eau (WFPS, Water Filled Pore Space).

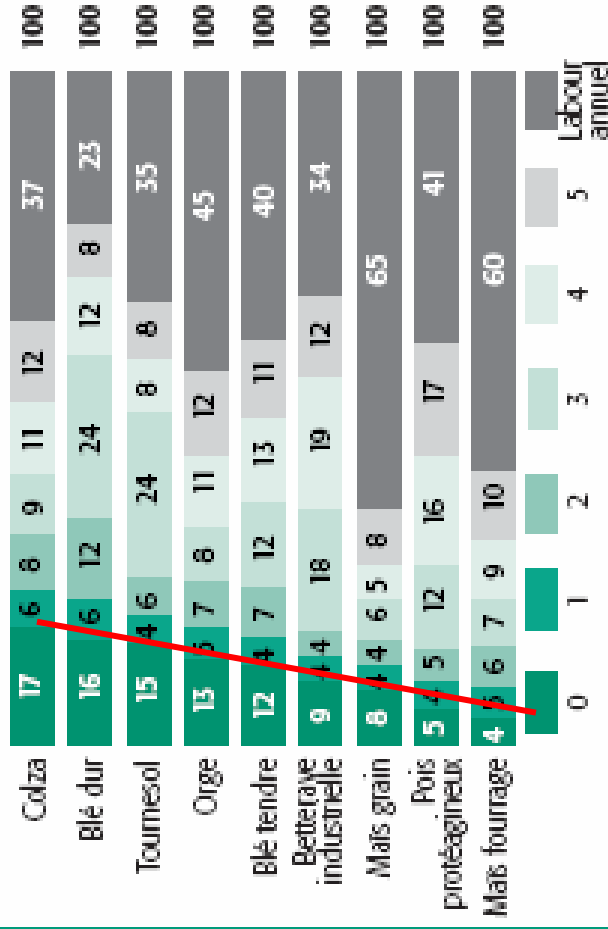
#### **4.4. Conséquences de nos résultats pour la gestion des agrosystèmes**

Ce travail de thèse a permis d'acquérir différents résultats et conclusions sur les effets de changements de gestions sur des communautés bactériennes importantes pour la gestion des agrosystèmes, à savoir le cycle de l'azote, cycle biogéochimique clé de la maîtrise de problèmes environnementaux.

Contrairement à ce qu'il est généralement admis, les travaux de Oorts et al. (2007) sur le site de Boigneville ont montré une émission accrue de CO<sub>2</sub> sur les parcelles en semis direct par rapport aux mêmes parcelles labourées. Les travaux du Shili (2006) et Léonard (2005) ont mis en évidence une émission accrue de CO<sub>2</sub> consécutives au labour de parcelles précédemment en semis direct (Boigneville) et au retournement de prairie (Lusignan). En parallèle, nous avons observé une plus forte capacité de dénitrification dans les sols en semis direct et en prairie, correspondant bien aux plus fortes émissions de N<sub>2</sub>O observées

## Ne jamais labourer reste l'exception

Superficies 2006 selon le nombre de labours depuis 2001<sup>1</sup> (en %)



1. Campagnes 2005-2006 et 2000-2001.

Lecture : 17 % des superficies de colza de 2006 n'ont jamais été labourées entre 2001 et 2006, 6 % ont connu un seul labour, 37 % ont été labourées tous les ans.

Source : Agreste - Enquête sur les pratiques culturales 2006

**Fig. 6 :** Fréquence des labours sur différentes cultures entre 2001 et 2006. La figure souligne qu'environ 80% des cultures ont subi au moins 2 labours en 6 ans. En d'autres termes, et notamment pour des problèmes de contrôle des mauvaises herbes, très peu de surfaces cultivées sont menées sans labour sur des durées de plus de 2 ou 3 ans, qui est la période au long de laquelle nous avons suivi les communautés bactériennes du sol après application ou cessation de labour.

précédemment par Oorts et al. (2007). Ceci est dû aux conditions favorables dans la couche superficielle du sol, où le carbone, l'azote et les activités microbiennes se concentrent. Nous avons aussi constaté que ni l'arrêt du labour, ni l'installation d'une prairie sur des sols de cultures ne permettent à court terme (2 à 3 ans) d'observer des caractéristiques bactériennes typiques des sols en semis direct et en prairies depuis plusieurs années. Il apparaît donc clairement que, dans une optique de séquestration du carbone, soit par implantation d'une prairie temporaire dans une rotation de cultures annuelles, soit par abandon du labour, les effets potentiellement bénéfiques de ces pratiques culturales sur l'accumulation de carbone organique dans le sol, nécessitent plusieurs années pour apparaître significativement, mais sont annulés en quelques jours à quelques semaines.

Sur la base de ces résultats, et sans tenir compte d'autres paramètres intervenant dans les bilans environnementaux (usage des fertilisants, pesticides, énergie pour le travail du sol...) il n'est donc pas possible de conclure de notre étude à court terme, que, le bilan environnemental soit amélioré par l'abandon du labour et l'implantation de la prairie, et encore moins par les fréquentes alternances prairie-culture et labour-non labour (Fig. 6).

## **Références bibliographiques**

## Références Bibliographiques

- Accoe, F., Boeckx, P., Busschaert, J., Hofman, G., and Van Cleemput, O. (2004) Gross N transformation rates and net N mineralisation rates related to the C and N contents of soil organic matter fractions in grassland soils of different age. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 2075-2087.
- Acutis, M., Ducco, G., and Grignani, C. (2000) Stochastic use of the LEACHN model to forecast nitrate leaching in different maize cropping systems. *European Journal of Agronomy* 13: 191-206.
- Alawi, M., Lipski, A., Sanders, T., Eva Maria, P., and Spieck, E. (2007) Cultivation of a novel cold-adapted nitrite oxidizing betaproteobacterium from the Siberian Arctic. *Isme Journal* 1: 256-264.
- Alexander, M. (1982) Most probable number method for microbial populations. In *Method of soil analysis*. Page, A.L., Miller, R.H., and Keeney, D.R. (eds). Madison, Wisconsin, USA: American Society of Agronomy, pp. 815-820.
- Ambus, P. (2005) Relationship between gross nitrogen cycling and nitrous oxide emission in grass-clover pasture. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 72: 189-199.
- Anderson, J.P.E., and Domsch, K.H. (1978) Physiological Method for Quantitative Measurement of Microbial Biomass in Soils. *Soil Biology & Biochemistry* 10: 215-221.
- Antil, R.S., Lovell, R.D., Hatch, D.J., and Jarvis, S.C. (2001) Mineralization of nitrogen in permanent pastures amended with fertilizer or dung. *Biology and Fertility of Soils* 33: 132-138.
- Attard, E., Poly, F., Laurent, F., Commeaux, C., Recous, S., and Le Roux, X. (submitted) Response of Nitrobacter-like nitrite oxidizers to changes in tillage practices: importance for changes in nitrite oxidation activity.
- Avrahami, S., Liesack, W., and Conrad, R. (2003) Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers. *Environmental Microbiology* 5: 691-705.
- Baggs, E.M., Chebii, J., and Ndufa, J.K. (2006) A short-term investigation of trace gas emissions following tillage and no-tillage of agroforestry residues in western Kenya. *Soil & Tillage Research* 90: 69-76.
- Baggs, E.M., Richter, M., Hartwig, U.A., and Cadisch, G. (2003) Nitrous oxide emissions from grass swards during the eighth year of elevated atmospheric pCO<sub>2</sub> (Swiss FACE). *Global Change Biology* 9: 1214-1222.
- Balesdent, J., Chenu, C., and Balabane, M. (2000) Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage. *Soil and Tillage Research* 53: 215-230.
- Balser, T.C., and Firestone, M.K. (2005) Linking microbial community composition and soil processes in a California annual grassland and mixed-conifer forest. *Biogeochemistry* 73: 395-415.
- Balser, T.C., McMahon, K.D., Bart, D., Bronson, D., Coyle, D.R., Craig, N. et al. (2006) Bridging the gap between micro - and macro-scale perspectives on the role of microbial communities in global change ecology. *Plant and Soil* 289: 59-70.
- Banning, N.C., Grant, C.D., Jones, D.L., and Murphy, D.V. (2008) Recovery of soil organic matter, organic matter turnover and nitrogen cycling in a post-mining forest rehabilitation chronosequence. *Soil Biology and Biochemistry* In Press, Uncorrected Proof.
- Bardgett, R.D., Hobbs, P.J., and Frostegard, A. (1996) Changes in soil fungal:bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland. *Biology and Fertility of Soils* 22: 261-264.



- Bardgett, R.D., Leemans, D.K., Cook, R., and Hobbs, P.J. (1997) Seasonality of the soil biota of grazed and ungrazed hill grasslands. *Soil Biology & Biochemistry* 29: 1285-1294.
- Bardgett, R.D., Jones, A.C., Jones, D.L., Kemmitt, S.J., Cook, R., and Hobbs, P.J. (2001) Soil microbial community patterns related to the history and intensity of grazing in sub-montane ecosystems. *Soil Biology & Biochemistry* 33: 1653-1664.
- Barnard, R., Le Roux, X., Hungate, B.A., Cleland, E.E., Blankinship, J.C., Barthes, L., and Leadley, P.W. (2006) Several components of global change alter nitrifying and denitrifying activities in an annual grassland. *Functional Ecology* 20: 557-564.
- Barraclough, D. (1991) The use of mean pool abundances to interpret <sup>15</sup>N tracer experiments. *Plant and Soil* 131: 89-96.
- Bartosch, S., Hartwig, C., Spieck, E., and Bock, E. (2002) Immunological detection of nitrospira-like bacteria in various soils. *Microbial Ecology* 43: 26-33.
- Baudoin, E., Benizri, E., and Guckert, A. (2003) Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* 35: 1183-1192.
- Bedard-Haughn, A., Matson, A.L., and Pennock, D.J. (2006) Land use effects on gross nitrogen mineralization, nitrification, and N<sub>2</sub>O emissions in ephemeral wetlands. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 3398-3406.
- Bijay, S., Ryden, J.C., and Whitehead, D.C. (1989) Denitrification potential and actual rates of denitrification in soils under long-term grassland and arable cropping. *Soil Biology and Biochemistry* 21: 897-901.
- Bittman, S., Forge, T.A., and Kowalenko, C.G. (2005) Responses of the bacterial and fungal biomass in a grassland soil to multi-year applications of dairy manure slurry and fertilizer. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 613-623.
- Blackburne, R., Vadivelu, V.M., Yuan, Z.G., and Keller, J. (2007) Kinetic characterisation of an enriched *Nitrospira* culture with comparison to *Nitrobacter*. *Water Research* 41: 3033-3042.
- Bock, E. (1976) Growth of *Nitrobacter* in Presence of Organic-Matter .2. Chemo-Organotrophic Growth of *Nitrobacter-Agilis*. *Archives of Microbiology* 108: 305-312.
- Bock, E., Koops, H.P., and Harms, H. (1986) Cell biology of nitrifying bacteria. In *Nitrification*. Irl Press, O., Washington DC (ed), pp. 17-38.
- Bol, R., Petersen, S.O., Christofides, C., Dittert, K., and Hansens, M.N. (2004) Short-term N<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> fluxes, and N/C transfers in a Danish grass-clover pasture after simulated urine deposition in autumn. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* 167: 568-576.
- Bol, R., Kandeler, E., Amelung, W., Glaser, B., Marx, M.C., Preedy, N., and Lorenz, K. (2003) Short-term effects of dairy slurry amendment on carbon sequestration and enzyme activities in a temperate grassland. *Soil Biology and Biochemistry* 35: 1411-1421.
- Booth, M.S., Stark, J.M., and Rastetter, E. (2005) Controls on nitrogen cycling in terrestrial ecosystems: A synthetic analysis of literature data. *Ecological Monographs* 75: 139-157.
- Bossio, D.A., Girvan, M.S., Verchot, L., Bullimore, J., Borelli, T., Albrecht, A. et al. (2005) Soil microbial community response to land use change in an agricultural landscape of Western Kenya. *Microbial Ecology* 49: 50-62.
- Bottomley, P.J., Taylor, A.E., Boyle, S.A., McMahon, S.K., Rich, J.J., Cromack, K., and Myrold, D.D. (2004) Responses of nitrification and ammonia-oxidizing bacteria to reciprocal transfers of soil between adjacent coniferous forest and meadow vegetation in the Cascade Mountains of Oregon. *Microbial Ecology* 48: 500-508.

- Bottomley, P.J., Yarwood, R.R., Kageyama, S.A., Waterstripe, K.E., Williams, M.A., Cromack, K., and Myrold, D.D. (2006) Responses of soil bacterial and fungal communities to reciprocal transfers of soil between adjacent coniferous forest and meadow vegetation in the Cascade Mountains of Oregon. *Plant and Soil* 289: 35-45.
- Bowatte, S., Asakawa, S., Okada, M., Kobayashi, K., and Kimura, M. (2007) Effect of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentration on ammonia oxidizing bacteria communities inhabiting in rice roots. *Soil Science and Plant Nutrition* 53: 32-39.
- Boyle, S.A., Rich, J.J., Bottomley, P.J., Cromack, K., and Myrold, D.D. (2006) Reciprocal transfer effects on denitrifying community composition and activity at forest and meadow sites in the Cascade Mountains of Oregon. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 870-878.
- Briones, A.M., Okabe, S., Umemiya, Y., Ramsing, N.B., Reichardt, W., and Okuyama, H. (2002) Influence of different cultivars on populations of ammonia-oxidizing bacteria in the root environment of rice. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3067-3075.
- Brooks, P.D., Stark, J.M., McInteer, B.B., and Preston, T. (1989) Diffusion Method to Prepare Soil Extracts for Automated N-15 Analysis. *Soil Science Society of America Journal* 53: 1707-1711.
- Bruns, M.A., Stephen, J.R., Kowalchuk, G.A., Prosser, J.I., and Paul, E.A. (1999) Comparative Diversity of Ammonia Oxidizer 16S rRNA Gene Sequences in Native, Tilled, and Successional Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2994-3000.
- Buckley, D.H., and Schmidt, T.M. (2001) The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microbial Ecology* 42: 11-21.
- Buckley, D.H., and Schmidt, T.M. (2003) Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environmental Microbiology* 5: 441-452.
- Burton, J., Chen, C., Xu, Z., and Ghadiri, H. (2007) Gross nitrogen transformations in adjacent native and plantation forests of subtropical Australia. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 426-433.
- Calderon, F.J., Jackson, L.E., Scow, K.M., and Rolston, D.E. (2001) Short-term dynamics of nitrogen, microbial activity, and phospholipid fatty acids after tillage. *Soil Science Society of America Journal* 65: 118-126.
- Campos, A. (2006) Response of soil surface CO<sub>2</sub>-C flux to land use changes in a tropical cloud forest (Mexico). *Forest Ecology and Management* 234: 305-312.
- Cavigelli, M.A., and Robertson, G.P. (2000) The functional significance of denitrifier community composition in a terrestrial ecosystem. *Ecology* 81: 1402-1414.
- Cebon, A., and Garnier, J. (2005) Nitrobacter and Nitrospira genera as representatives of nitrite-oxidizing bacteria: Detection, quantification and growth along the lower Seine River (France). *Water Research* 39: 4979-4992.
- Cebon, A., Berthe, T., and Garnier, J. (2003) Nitrification and nitrifying bacteria in the lower Seine River and estuary (France). *Applied and Environmental Microbiology* 69: 7091-7100.
- Chapelle-Barry, C. (2008) Dans le sillon du non-labour. *Agreste-primeur* 207.
- Chapman, S.J., Campbell, C.D., and Puri, G. (2003) Native woodland expansion: soil chemical and microbiological indicators of change. *Soil Biology & Biochemistry* 35: 753-764.
- Chen, C.R., Condron, L.M., Davis, M.R., and Sherlock, R.R. (2000) Effects of afforestation on phosphorus dynamics and biological properties in a New Zealand grassland soil. *Plant and Soil* 220: 151-163.
- Chenu, C., Hassink, J., and Bloem, J. (2001) Short-term changes in the spatial distribution of microorganisms in soil aggregates as affected by glucose addition. *Biology and Fertility of Soils* 34: 349-356.

- Chotte, J.L., Schwartzmann, A., Bally, R., and Monrozier, L.J. (2002) Changes in bacterial communities and Azospirillum diversity in soil fractions of a tropical soil under 3 or 19 years of natural fallow. *Soil Biology & Biochemistry* 34: 1083-1092.
- Clarke, K.R., and Ainsworth, M. (1993) A Method of Linking Multivariate Community Structure to Environmental Variables. *Marine Ecology-Progress Series* 92: 205-219.
- Clegg, C.D. (2006) Impact of cattle grazing and inorganic fertiliser additions to managed grasslands on the microbial community composition of soils. *Applied Soil Ecology* 31: 73-82.
- Clegg, C.D., Lovell, R.D.L., and Hobbs, P.J. (2003) The impact of grassland management regime on the community structure of selected bacterial groups in soils. *Fems Microbiology Ecology* 43: 263-270.
- Cole, S.T., and Saintgiron, I. (1994) Bacterial Genomics. *Fems Microbiology Reviews* 14: 139-160.
- Commeaux, C., Poly, F., and Le Roux, X. (2008) In prep.
- Cookson, W.R., Abaye, D.A., Marschner, P., Murphy, D.V., Stockdale, E.A., and Goulding, K.W.T. (2005) The contribution of soil organic matter fractions to carbon and nitrogen mineralization and microbial community size and structure. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 1726-1737.
- Cookson, W.R., Osman, M., Marschner, P., Abaye, D.A., Clark, I., Murphy, D.V. et al. (2007) Controls on soil nitrogen cycling and microbial community composition across land use and incubation temperature. *Soil Biology & Biochemistry* 39: 744-756.
- Costanza, R., d'Arge, R., deGroot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B. et al. (1997) The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387: 253-260.
- Csatho, P., Sisak, I., Radimsky, L., Lushaj, S., Spiegel, H., Nikolova, M.T. et al. (2007) Agriculture as a source of phosphorus causing eutrophication in Central and Eastern Europe. *Soil Use and Management* 23: 36-56.
- Degrange, V., Lensi, R., and Bardin, R. (1997) Activity, size and structure of a Nitrobacter community as affected by organic carbon and nitrite in sterile soil. *FEMS Microbiology Ecology* 24: 173-180.
- Diaz, S., Lavorel, S., de Bello, F., Quetier, F., Grigulis, K., and Robson, T.M. (2007) Land Change Science Special Feature: Incorporating plant functional diversity effects in ecosystem service assessments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 20684-20689.
- Doak, B.W. (1952) Some chemical changes in the nitrogenous constituents of urine when voided on pasture. *J. Agric. Sci* 42: 162-171.
- Dobbie, K.E., and Smith, K.A. (2003) Nitrous oxide emission factors for agricultural soils in Great Britain: the impact of soil water-filled pore space and other controlling variables. *Global Change Biology* 9: 204-218.
- Donnison, L.M., Griffith, G.S., Hedger, J., Hobbs, P.J., and Bardgett, R.D. (2000) Management influences on soil microbial communities and their function in botanically diverse haymeadows of northern England and Wales. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 253-263.
- Enwall, K., Philippot, L., and Hallin, S. (2005) Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 8335-8343.
- FAO (2008). *Agriculture sans labour*
- Felske, A., Wolterink, A., Van Lis, R., De Vos, W.M., and Akkermans, A.D.L. (2000) Response of a soil bacterial community to grassland succession as monitored by 16S rRNA levels of the predominant ribotypes. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3998-4003.

- Feray, C., and Montuelle, B. (2002) Competition between two nitrite-oxidizing bacterial populations: a model for studying the impact of wastewater treatment plant discharge on nitrification in sediment. *FEMS Microbiology Ecology* 42: 15-23.
- Fierer, N., Schimel, J.P., and Holden, P.A. (2003) Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biology & Biochemistry* 35: 167-176.
- Foley, J.A., DeFries, R., Asner, G.P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S.R. et al. (2005) Global consequences of land use. *Science* 309: 570-574.
- Freitag, T.E., Chang, L., Clegg, C.D., and Prosser, J.I. (2005) Influence of inorganic nitrogen management regime on the diversity of nitrite-oxidizing bacteria in agricultural grassland soils. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 8323-8334.
- Galtier, N., Gouy, M., and Gautier, C. (1996) SEAVIEW and PHYLO\_WIN: Two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 543-548.
- Garbeva, P., Postma, J., van Veen, J.A., and van Elsas, J.D. (2006) Effect of above-ground plant species on soil microbial community structure and its impact on suppression of *Rhizoctonia solani* AG3. *Environmental Microbiology* 8: 233-246.
- Garnier, P., Neel, C., Aita, C., Recous, S., Lafolie, F., and Mary, B. (2003) Modelling carbon and nitrogen dynamics in a bare soil with and without straw incorporation. *European Journal of Soil Science* 54: 555-568.
- Glibert, P., Harrison, J., Heil, C., and Seitzinger, S. (2006) Escalating Worldwide use of Urea – A Global Change Contributing to Coastal Eutrophication. *Biogeochemistry* 77: 441-463.
- Gomez, E., Garland, J., and Conti, M. (2004) Reproducibility in the response of soil bacterial community-level physiological profiles from a land use intensification gradient. *Applied Soil Ecology* 26: 21-30.
- Grayston, S.J., Campbell, C.D., Bardgett, R.D., Mawdsley, J.L., Clegg, C.D., Ritz, K. et al. (2004) Assessing shifts in microbial community structure across a range of grasslands of differing management intensity using CLPP, PLFA and community DNA techniques. *Applied Soil Ecology* 25: 63-84.
- Gunderson, L.H. (2000) Ecological resilience - in theory and application. *Annual Review of Ecological Systems* 31: 425-439.
- Guo, L.B., and Gifford, R.M. (2002) Soil carbon stocks and land use change: a meta analysis. *Global Change Biology* 8: 345-360.
- Hart, S.C., Binkley, D., and Perry, D.A. (1997) Influence of red alder on soil nitrogen transformations in two conifer forests of contrasting productivity. *Soil Biology and Biochemistry* 29: 1111-1123.
- Hatch, D.J., Sprosen, M.S., Jarvis, S.C., and Ledgard, S.F. (2002) Use of labelled nitrogen to measure gross and net rates of mineralization and microbial activity in permanent pastures following fertilizer applications at different time intervals. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16: 2172-2178.
- Hatch, D.J., Lovell, R.D., Antil, R.S., Jarvis, S.C., and Owen, P.M. (2000) Nitrogen mineralization and microbial activity in permanent pastures amended with nitrogen fertilizer or dung. *Biology and Fertility of Soils* 30: 288-293.
- Hattori, T. (1988) Soil aggregates as microhabitats of microorganisms. *Biol. Fertil. Soils*. 6: 189-203.
- He, J., Shen, J., Zhang, L., Zhu, Y., Zheng, Y., Xu, M., and Di, H.J. (2007) Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environmental Microbiology* 9: 2364-2374.

- Hedlund, K. (2002) Soil microbial community structure in relation to vegetation management on former agricultural land. *Soil Biology & Biochemistry* 34: 1299-1307.
- Henault, C., Bizouard, F., Laville, P., Gabrielle, B., Nicoullaud, B., Germon, J.C., and Cellier, P. (2005) Predicting in situ soil N<sub>2</sub>O emission using NOE algorithm and soil database. *Global Change Biology* 11: 115-127.
- Henry, S., Bru, D., Stres, B., Hallet, S., and Philippot, L. (2006) Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 5181-5189.
- Henry, S., Baudoin, E., Lopez-Gutierrez, J.C., Martin-Laurent, F., Baumann, A., and Philippot, L. (2004) Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 59: 327-335.
- Hofstra, N., and Bouwman, A.F. (2005) Denitrification in agricultural soils: Summarizing published data and estimating global annual rates. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 72: 267-278.
- Hojberg, O., Binnerup, S.J., and Sorensen, J. (1996) Potential rates of ammonium oxidation, nitrite oxidation, nitrate reduction and denitrification in the young barley rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* 28: 47-54.
- Holland, J.M. (2004) The environmental consequences of adopting conservation tillage in Europe: reviewing the evidence. *Agriculture Ecosystems & Environment* 103: 1-25.
- Hooper, D.U., Chapin, F.S., Ewel, J.J., Hector, A., Inchausti, P., Lavorel, S. et al. (2005) Effects of biodiversity on ecosystem functioning: A consensus of current knowledge. *Ecological Monographs* 75: 3-35.
- Horz, H.P., Barbrook, A., Field, C.B., and Bohannon, B.J.M. (2004) Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 15136-15141.
- Jacinthe, P.A., and Lal, R. (2005) Labile carbon and methane uptake as affected by tillage intensity in a Mollisol. *Soil & Tillage Research* 80: 35-45.
- Johnson, J.M.F., Franzluebbers, A.J., Weyers, S.L., and Reicosky, D.C. (2007) Agricultural opportunities to mitigate greenhouse gas emissions. *Environmental Pollution* 150: 107-124.
- Kamphake, L.J., Hannah, S.A., and Cohen, J.M. (1967) Automated Analysis for Nitrate by Hydrazine Reduction. *Water Research* 1: 205-&.
- Kandeler, E., Deiglmayr, K., Tschirko, D., Bru, D., and Philippot, L. (2006) Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 5957-5962.
- Khan, F.A., and Ansari, A.A. (2005) Eutrophication: An ecological vision. *Botanical Review* 71: 449-482.
- Kim, D.J., and Kim, S.H. (2006) Effect of nitrite concentration on the distribution and competition of nitrite-oxidizing bacteria in nitrification reactor systems and their kinetic characteristics. *Water Research* 40: 887-894.
- Klein, D.A., McLendon, T., Paschke, M.W., and Redente, E.F. (1995) Saprophytic Fungal-Bacterial Biomass Variations in Successional Communities of a Semiarid Steppe Ecosystem. *Biology and Fertility of Soils* 19: 253-256.
- Koops, H.P., and Pommerening-Roser, A. (2001) Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *Fems Microbiology Ecology* 37: 1-9.
- Kowalchuk, G.A., and Stephen, J.R. (2001) Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annual Review of Microbiology* 55: 485-529.
- Kowalchuk, G.A., Stienstra, A.W., Heilig, G.H.J., Stephen, J.R., and Woldendorp, J.W. (2000a) Molecular analysis of ammonia-oxidising bacteria in soil of successional

- grasslands of the Drentsche A (The Netherlands). *Fems Microbiology Ecology* 31: 207-215.
- Kowalchuk, G.A., Stienstra, A.W., Heilig, G.H.J., Stephen, J.R., and Woldendorp, J.W. (2000b) Changes in the community structure of ammonia-oxidizing bacteria during secondary succession of calcareous grasslands. *Environmental Microbiology* 2: 99-110.
- Kowalchuk, G.A., Buma, D.S., de Boer, W., Klinkhamer, P.G.L., and van Veen, J.A. (2002) Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 81: 509-520.
- Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R., DeBoer, W., Prosser, J.I., Embley, T.M., and Woldendorp, J.W. (1997) Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1489-1497.
- Krom, M.D. (1980) Spectrophotometric Determination of Ammonia - a Study of a Modified Berthelot Reaction Using Salicylate and Dichloroisocyanurate. *Analyst* 105: 305-316.
- Kruskal, J.B.a.M.W. (1978) Multidimensional scaling. In: Sage publications, B.H.C. (ed).
- Laville, P., Henault, C., Gabrielle, B., and Serca, D. (2005) Measurement and modelling of NO fluxes on maize and wheat crops during their growing seasons: effect of crop management. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 72: 159-171.
- Le Roux, X., Bardy, M., Loiseau, P., and Louault, F. (2003) Stimulation of soil nitrification and denitrification by grazing in grasslands: do changes in plant species composition matter? *Oecologia* 137: 417-425.
- Le Roux, X., Poly, F., Currey, P., Commeaux, C., Hai, B., Nicol, G.W. et al. (2008) Effects of aboveground grazing on coupling between nitrifier activity, abundance and community structure.
- Ledgard, S.F., Jarvis, S.C., and Hatch, D.J. (1998) Short-term nitrogen fluxes in grassland soils under different long-term nitrogen management regimes. *Soil Biology & Biochemistry* 30: 1233-1241.
- Lee, A., and Slak, M.-F. (2007) Les paysages français changent entre 1992 et 2002 : artificialisation et fermeture des paysages aux dépens du mitage ou de la déprise des zones agricoles. *Agreste-cahiers* 3.
- Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W. et al. (2006) Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442: 806-809.
- Lensi, R., Claysjoserand, A., and Monrozier, L.J. (1995) Denitrifiers and Denitrifying Activity in Size Fractions of a Mollisol under Permanent Pasture and Continuous Cultivation. *Soil Biology & Biochemistry* 27: 61-69.
- Li, C.S. (2000) Modeling trace gas emissions from agricultural ecosystems. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 58: 259-276.
- Lin, X.G., Yin, R., Zhang, H.Y., Huang, J.F., Chen, R.R., and Cao, Z.H. (2004) Changes of Soil Microbiological Properties Caused by Land Use Changing From Rice–Wheat Rotation to Vegetable Cultivation. *Environmental Geochemistry and Health* 26: 119-128.
- Liu, X., Mosier, A., Halvorson, A., and Zhang, F. (2006) The Impact of Nitrogen Placement and Tillage on NO, N<sub>2</sub>O, CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> Fluxes from a Clay Loam Soil. *Plant and Soil* 280: 177-188.
- Liu, X.D., Tiquia, S.M., Holguin, G., Wu, L.Y., Nold, S.C., Devol, A.H. et al. (2003) Molecular diversity of denitrifying genes in continental margin sediments within the oxygen-deficient zone off the Pacific coast of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3549-3560.

- Liu, X.J.J., Mosier, A.R., Halvorson, A.D., Reule, C.A., and Zhang, F.S. (2007) Dinitrogen and N<sub>2</sub>O emissions in arable soils: Effect of tillage, N source and soil moisture. *Soil Biology & Biochemistry* 39: 2362-2370.
- Loiseau, P., Louault, F., Le Roux, X., and Bardy, M. (2005) Does extensification of rich grasslands alter the C and N cycles, directly or via species composition? *Basic and Applied Ecology* 6: 275-287.
- Loisel, P., Harmand, J., Zemb, O., Latrille, E., Lobry, C., Delgenes, J.P., and Godon, J.J. (2006) Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environmental Microbiology* 8: 720-731.
- Lovell, R.D., and Jarvis, S.C. (1996) Effects of urine on soil microbial biomass, methanogenesis, nitrification and denitrification in grassland soils. *Plant and Soil* 186: 265-273.
- Lovell, R.D., Jarvis, S.C., and Bardgett, R.D. (1995) Soil Microbial Biomass and Activity in Long-Term Grassland - Effects of Management Changes. *Soil Biology & Biochemistry* 27: 969-975.
- Luxhoi, J., Recous, S., Fillery, I.R.P., Murphy, D.V., and Jensen, L.S. (2005) Comparison of <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pool dilution techniques to measure gross N fluxes in a coarse textured soil. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 569-572.
- Luxhoi, J., Bruun, S., Stenberg, B., Breland, T.A., and Jensen, L.S. (2006) Prediction of gross and net nitrogen mineralization-immobilization turnover from respiration. *Soil Science Society of America Journal* 70: 1121-1128.
- Luxhoi, J., I.R.P. F., D.V. M., S, B., L.S, J., and Recous, S. (2008) Distribution and controls on gross N mineralization-immobilization-turnover in soil subjected to zero tillage.
- Ma, W.K., Bedard-Haughn, A., Siciliano, S.D., and Farrell, R.E. (2008) Relationship between nitrifier and denitrifier community composition and abundance in predicting nitrous oxide emissions from ephemeral wetland soils. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 1114-1123.
- Machado, P., and Silva, C.A. (2001) Soil management under no-tillage systems in the tropics with special reference to Brazil. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 61: 119-130.
- Maixner, F., Noguera, D.R., Anneser, B., Stoecker, K., Wegl, G., Wagner, M., and Daims, H. (2006) Nitrite concentration influences the population structure of Nitrospira-like bacteria. *Environmental Microbiology* 8: 1487-1495.
- Maly, S., Korthals, G.W., Van Dijk, C., Van der Putten, W.H., and De Boer, W. (2000) Effect of vegetation manipulation of abandoned arable land on soil microbial properties. *Biology and Fertility of Soils* 31: 121-127.
- Mary, B., Recous, S., and Robin, D. (1998) A model for calculating nitrogen fluxes in soil using N-15 tracing. *Soil Biology & Biochemistry* 30: 1963-1979.
- Matson, P.A., Parton, W.J., Power, A.G., and Swift, M.J. (1997) Agricultural intensification and ecosystem properties. *Science* 277: 504-509.
- McCaig, A.E., Glover, L.A., and Prosser, J.I. (1999) Molecular Analysis of Bacterial Community Structure and Diversity in Unimproved and Improved Upland Grass Pastures. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1721-1730.
- McKinley, V.L., Peacock, A.D., and White, D.C. (2005) Microbial community PLFA and PHB responses to ecosystem restoration in tallgrass prairie soils. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 1946-1958.
- Mendum, T.A., Sockett, R.E., and Hirsch, P.R. (1999) Use of molecular and isotopic techniques to monitor the response of autotrophic ammonia-oxidizing populations of the beta subdivision of the class Proteobacteria in arable soils to nitrogen fertilizer. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4155-4162.

- Merino, A., Perez-Batallon, P., and Macias, F. (2004) Responses of soil organic matter and greenhouse gas fluxes to soil management and land use changes in a humid temperate region of southern Europe. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 917-925.
- Mishra, S., Di, H.J., Cameron, K.C., Monaghan, R., and Carran, A. (2005) Gross nitrogen mineralisation rates in pastural soils and their relationships with organic nitrogen fractions, microbial biomass and protease activity under glasshouse conditions. *Biology and Fertility of Soils* 42: 45-53.
- Mosier, A.R., Parton, W.J., Valentine, D.W., Ojima, D.S., Schimel, D.S., and Heinemeyer, O. (1997) CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O fluxes in the Colorado shortgrass steppe .2. Long-term impact of land use change. *Global Biogeochemical Cycles* 11: 29-42.
- Mounier, E., Hallet, S., Cheneby, D., Benizri, E., Gruet, Y., Nguyen, C. et al. (2004) Influence of maize mucilage on the diversity and activity of the denitrifying community. *Environmental Microbiology* 6: 301-312.
- Mummey, D., Holben, W., Six, J., and Stahl, P. (2006) Spatial stratification of soil bacterial populations in aggregates of diverse soils. *Microbial Ecology* 51: 404-411.
- Murphy, D.V., Recous, S., Stockdale, E.A., Fillery, I.R.P., Jensen, L.S., Hatch, D.J. et al. (2003) Gross nitrogen fluxes in soil : theory, measurement and application of <sup>15</sup>N pool dilution techniques. In *Advances in Agronomy: Academic Press*, pp. 69-118.
- Murty, D., Kirschbaum, M.U.F., McMurtrie, R.E., and McGilvray, A. (2002) Does conversion of forest to agricultural land change soil carbon and nitrogen? a review of the literature. *Global Change Biology* 8: 105-123.
- Muyzer, G., Dewaal, E.C., and Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes-Coding for 16s Ribosomal-Rna. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695-700.
- Nakamoto, T., Yamagishi, J., and Miura, E. (2006) Effect of reduced tillage on weeds and soil organisms in winter wheat and summer maize cropping on Humic Andosols in Central Japan. *Soil & Tillage Research* 85: 94-106.
- Navarro, E., Simonet, P., Normand, P., and Bardin, R. (1992) Characterization of Natural Populations of *Nitrobacter* Spp Using Pcr/Rflp Analysis of the Ribosomal Intergenic Spacer. *Archives of Microbiology* 157: 107-115.
- Nazaret, S., Ranjard, L., and Richaume, A. (1999) L'impact du mercure sur les bactéries telluriques. *Biofutur* 185.
- Newton, W.E. (2007) Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of Nitrogen Fixation. In *Biology of the Nitrogen Cycle*. Bothe, H., Ferguson, S.J., and Newton, W.E. (eds). Amsterdam: Elsevier, pp. 109-129.
- Nicol, G.W., Campbell, C.D., Chapman, S.J., and Prosser, J.I. (2007) Afforestation of moorland leads to changes in crenarchaeal community structure. *Fems Microbiology Ecology* 60: 51-59.
- Normand, P., Ponsonnet, C., Nesme, X., Neyra, M., and Simonet, P. (1996) ITS analysis of prokaryotes. In *Molecular Microbial Ecology Manual: Kluwer Academic Publishers, Netherlands.*, pp. Pp.1-12.
- Norton, J.M., Low, J.M., and Martin, G. (1996) The gene encoding ammonia monooxygenase subunit A exists in three nearly identical copies in *Nitrosospira* sp NpAV. *Fems Microbiology Letters* 139: 181-188.
- Nunan, N., Singh, B., Reid, E., Ord, B., Papert, A., Squires, J. et al. (2006) Sheep-urine-induced changes in soil microbial community structure. *Fems Microbiology Ecology* 56: 310-320.
- Oades, J., and Waters, A. (1991) Aggregate hierarchy in soils. *J Australian Journal of Soil Research* 29: 815-828.



- Oehler, F., Bordenave, P., and Durand, P. (2007) Variations of denitrification in a farming catchment area. *Agriculture Ecosystems & Environment* 120: 313-324.
- Omonode, R.A., Vyn, T.J., Smith, D.R., Hegymegi, P., and Gal, A. (2007) Soil carbon dioxide and methane fluxes from long-term tillage systems in continuous corn and corn-soybean rotations. *Soil & Tillage Research* 95: 182-195.
- Oorts, K., Merckx, R., Grehan, E., Labreuche, J., and Nicolardot, B. (2007a) Determinants of annual fluxes of CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O in long-term no-tillage and conventional tillage systems in northern France. *Soil & Tillage Research* 95: 133-148.
- Oorts, K., Laurent, F., Mary, B., Thiebeau, P., Labreuche, J., and Nicolardot, B. (2007b) Experimental and simulated soil mineral N dynamics for long-term tillage systems in northern France. *Soil & Tillage Research* 94: 441-456.
- Op den Camp, H.J.M., Jetten, M.S.L., and Strous, M. (2007) Anammox. In *Biology of the Nitrogen Cycle*. Bothe, H., Ferguson, S.J., and Newton, W.E. (eds). Amsterdam: Elsevier, pp. 245-262.
- Orso, S., Gouy, M., Navarro, E., and Normand, P. (1994) Molecular Phylogenetic Analysis of *Nitrobacter* Spp. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 83-86.
- Palacio-Rabaud, V. (2000) La conduite des prairies en France : pratiques intensives et rendements élevés dans le Nord-Ouest. *Agreste-cahiers* 4.
- Pankhurst, C.E., Kirkby, C.A., Hawke, B.G., and Harch, B.D. (2002) Impact of a change in tillage and crop residue management practice on soil chemical and microbiological properties in a cereal-producing red duplex soil in NSW, Australia. *Biology and Fertility of Soils* 35: 189-196.
- Paterson, E., and Sim, A. (1999) Rhizodeposition and C-partitioning of *Lolium perenne* in axenic culture affected by nitrogen supply and defoliation. *Plant and Soil* 216: 155-164.
- Patra, A.K., Abbadie, L., Clays-Josserand, A., Degrange, V., Grayston, S.J., Loiseau, P. et al. (2005) Effects of grazing on microbial functional groups involved in soil N dynamics. *Ecological Monographs* 75: 65-80.
- Patra, A.K., Abbadie, L., Clays-Josserand, A., Degrange, V., Grayston, S.J., Guillaumaud, N. et al. (2006) Effects of management regime and plant species on the enzyme activity and genetic structure of N-fixing, denitrifying and nitrifying bacterial communities in grassland soils. *Environmental Microbiology* 8: 1005-1016.
- Petersen, S.O., Roslev, P., and Bol, R. (2004) Dynamics of a pasture soil microbial community after deposition of cattle urine amended with [C-13]urea. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 6363-6369.
- Petersen, S.O., Schjonning, P., Thomsen, I.K., and Christensen, B.T. (2008) Nitrous oxide evolution from structurally intact soil as influenced by tillage and soil water content. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 967-977.
- Peterson, G., Allen, C.R., and Holling, C.S. (1998) Ecological resilience, biodiversity, and scale. *Ecosystems* 1: 6-18.
- Philippot, L. (2002) Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. *Biochimica Et Biophysica Acta- Gene Structure and Expression* 1577: 355-376.
- Philippot, L., Hallin, S., and Schloter, M. (2007) Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil. In *Advances in Agronomy*, Vol 96, pp. 249-305.
- Phillips, C.J., Harris, D., Dollhopf, S.L., Gross, K.L., Prosser, J.I., and Paul, E.A. (2000) Effects of Agronomic Treatments on Structure and Function of Ammonia-Oxidizing Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5410-5418.
- Poly, F., Wertz, S., Brothier, E., and Degrange, V. (2008) First exploration of *Nitrobacter* diversity in soils by a PCR cloning-sequencing approach targeting functional gene *nxrA*. *FEMS Microbiology Ecology* 63: 132-140.

- Post, W.M., and Kwon, K.C. (2000) Soil carbon sequestration and land-use change: processes and potential. *Global Change Biology* 6: 317-327.
- Prieme, A., Christensen, S., Dobbie, K.E., and Smith, K.A. (1997) Slow increase in rate of methane oxidation in soils with time following land use change from arable agriculture to woodland. *Soil Biology and Biochemistry* 29: 1269-1273.
- Prosser, J.I. (1989) Autotrophic Nitrification in Bacteria. *Advances in Microbial Physiology* 30: 125-181.
- Rabaud, V. (2004) Peu de pratiques alternatives en grandes cultures. *Agreste-primeurs* 149.
- Rabaud, V. (2005) Les prairies alimentent les changements fonciers. *Agreste-primeurs* 168.
- Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N.R., and Murrell, J.C. (2000) Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* 403: 646-649.
- Raiesi, F. (2007) The conversion of overgrazed pastures to almond orchards and alfalfa cropping systems may favor microbial indicators of soil quality in Central Iran. *Agriculture Ecosystems & Environment* 121: 309-318.
- Ranjard, L., and Richaume, A. (2001) Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Research in Microbiology* 152: 707-716.
- Ranjard, L., Richaume, A., Jocteur-Monrozier, L., and Nazaret, S. (1997) Response of soil bacteria to Hg(II) in relation to soil characteristics and cell location. *FEMS Microbiology Ecology* 24: 321-331.
- Ranjard, L., Nazaret, S., Gourbiere, F., Thioulouse, J., Linet, P., and Richaume, A. (2000) A soil microscale study to reveal the heterogeneity of Hg(II) impact on indigenous bacteria by quantification of adapted phenotypes and analysis of community DNA fingerprints. *FEMS Microbiology Ecology* 31: 107-115.
- Recous, S., Aita, C., and Mary, B. (1999) In situ changes in gross N transformations in bare soil after addition of straw. *Soil Biology & Biochemistry* 31: 119-133.
- Rich, J.J., Heichen, R.S., Bottomley, P.J., Cromack, K., and Myrold, D.D. (2003) Community composition and functioning of denitrifying bacteria from adjacent meadow and forest soils. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 5974-5982.
- Richter, M., Hartwig, U.A., Frossard, E., Nosberger, J., and Cadisch, G. (2003) Gross fluxes of nitrogen in grassland soil exposed to elevated atmospheric pCO<sub>2</sub> for seven years. *Soil Biology & Biochemistry* 35: 1325-1335.
- Robinson, R.A., and Sutherland, W.J. (2002) Post-war changes in arable farming and biodiversity in Great Britain. *Journal of Applied Ecology* 39: 157-176.
- Robson, T.M., Lavorel, S., Clement, J.C., and Le Roux, X. (2007) Neglect of mowing and manuring leads to slower nitrogen cycling in subalpine grasslands. *Soil Biology & Biochemistry* 39: 930-941.
- Rooney, D., Kennedy, N., Deering, L., Gleeson, D., and Clipson, N. (2006) Effect of sheep urine deposition on the bacterial community structure in an acidic upland grassland soil. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 7231-7237.
- Sala, O.E., Chapin, F.S., Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R. et al. (2000) Biodiversity - Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287: 1770-1774.
- Salles, J.F., van Elsas, J.D., and van Veen, J.A. (2006a) Effect of agricultural management regime on Burkholderia community structure in soil. *Microbial Ecology* 52: 267-279.
- Salles, J.F., Samyn, E., Vandamme, P., van Veen, J.A., and van Elsas, J.D. (2006b) Changes in agricultural management drive the diversity of Burkholderia species isolated from soil on PCAT medium. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 661-673.
- Schimel, J. (1995) Ecosystem consequences of microbial diversity and community structure. In *Arctic and Alpine Biodiversity: Patterns, Causes and Ecosystem Consequences*. C., C.F.S.I.a.K. (ed). New York: Springer Verlag, pp. 239-254.

- Schramm, A., de Beer, D., van den Heuvel, J.C., Ottengraf, S., and Amann, R. (1999) Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: Quantification by in situ hybridization and the use of microsensors. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3690-3696.
- Sharma, V., Noriega, C.E., and Rowe, J.J. (2006) Involvement of NarK1 and NarK2 proteins in transport of nitrate and nitrite in the denitrifying bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 695-701.
- Shindo, H., and Nishio, T. (2005) Immobilization and remineralization of N following addition of wheat straw into soil: determination of gross N transformation rates by N-15-ammonium isotope dilution technique. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 425-432.
- Silva, R.G., Jorgensen, E.E., Holub, S.M., and Gonsoulin, M.E. (2005) Relationships between culturable soil microbial populations and gross nitrogen transformation processes in a clay loam soil across ecosystems. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 71: 259-270.
- Singh, B.K., Tate, K.R., Kolipaka, G., Hedley, C.B., Macdonald, C.A., Millard, P., and Murrell, J.C. (2007) Effect of afforestation and reforestation of pastures on the activity and population dynamics of methanotrophic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5153-5161.
- Siripong, S., and Rittmann, B.E. (2007) Diversity study of nitrifying bacteria in full-scale municipal wastewater treatment plants. *Water Research* 41: 1110-1120.
- Six, J., Feller, C., Denef, K., Ogle, S.M., Sa, J.C.D., and Albrecht, A. (2002) Soil organic matter, biota and aggregation in temperate and tropical soils - Effects of no-tillage. *Agronomie* 22: 755-775.
- Six, J., Ogle, S.M., Breidt, F.J., Conant, R.T., Mosier, A.R., and Paustian, K. (2004) The potential to mitigate global warming with no-tillage management is only realized when practised in the long term. *Global Change Biology* 10: 155-160.
- Smith, M.S., and Tiedje, J.M. (1979) Phases of Denitrification Following Oxygen Depletion in Soil. *Soil Biology & Biochemistry* 11: 261-267.
- Smith, P., Andren, O., Brussaard, L., Dangerfield, M., Ekschmitt, K., Lavelle, P., and Tate, K. (1998) Soil biota and global change at the ecosystem level: describing soil biota in mathematical models. *Global Change Biology* 4: 773-784.
- Smorzewski, W.T., and Schmidt, E.L. (1991) Numbers, Activities, and Diversity of Autotrophic Ammonia-Oxidizing Bacteria in a Fresh-Water, Eutrophic Lake Sediment. *Canadian Journal of Microbiology* 37: 828-833.
- Steinmuller, W., and Bock, E. (1976) Growth of *Nitrobacter* in Presence of Organic-Matter .1. Mixotrophic Growth. *Archives of Microbiology* 108: 299-304.
- Stockdale, E.A., Hatch, D.J., Murphy, D.V., Ledgard, S.F., and Watson, C.J. (2002) Verifying the nitrification to immobilisation ratio (N/I) as a key determinant of potential nitrate loss in grassland and arable soils. *Agronomie* 22: 831-838.
- Tebrügge, F., and Düring, R.A. (1999) Reducing tillage intensity -- a review of results from a long-term study in Germany. *Soil and Tillage Research* 53: 15-28.
- Templer, P.H., Groffman, P.M., Flecker, A.S., and Power, A.G. (2005) Land use change and soil nutrient transformations in the Los Haitises region of the Dominican Republic. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 215-225.
- Teske, A., Alm, E., Regan, J.M., Toze, S., Rittmann, B.E., and Stahl, D.A. (1994) Evolutionary Relationships among Ammonia-Oxidizing and Nitrite-Oxidizing Bacteria. *Journal of Bacteriology* 176: 6623-6630.
- Tiedje, J.M. (1983) Denitrification. In *Methods of soil analysis. Part 2. Agron. Monogr. al, A.L.p.e. (ed): 9 ASA, Madison WI. , pp. 1011-1026.*

- Tiedje, J.M. (1988) Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In *Biology of anaerobic microorganisms*. B, Z.A.J. (ed): John Wiley and Sons, New York, N. Y.
- Tiedje, J.M., Simkins, S., and Groffman, P.M. (1989) Perspectives on Measurement of Denitrification in the Field Including Recommended Protocols for Acetylene Based Methods. *Plant and Soil* 115: 261-284.
- Tiedje, J.M., Asuming-Brempong, S., Nusslein, K., Marsh, T.L., and Flynn, S.J. (1999) Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology* 13: 109-122.
- Tilman, D. (1999) Global environmental impacts of agricultural expansion: The need for sustainable and efficient practices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 5995-6000.
- Tilman, D., Knops, J., Wedin, D., Reich, P., Ritchie, M., and Siemann, E. (1997) The influence of functional diversity and composition on ecosystem processes. *Science* 277: 1300-1302.
- Trinsoutrot, I., Recous, S., Mary, B., and Nicolardota, B. (2000) C and N fluxes of decomposing C-13 and N-15 Brassica napus L.: effects of residue composition and N content. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 1717-1730.
- USDA (2001) Conservation tillage firmly planted in US agriculture.
- van Bochove, E., Prevost, D., and Pelletier, F. (2000) Effects of freeze-thaw and soil structure on nitrous oxide produced in a clay soil. *Soil Science Society of America Journal* 64: 1638-1643.
- Vance, E.D., Brookes, P.C., and Jenkinson, D.S. (1987) An Extraction Method for Measuring Soil Microbial Biomass-C. *Soil Biology & Biochemistry* 19: 703-707.
- Vanparys, B., Spieck, E., Heylen, K., Wittebolle, L., Geets, J., Boon, N., and De Vos, P. (2007) The phylogeny of the genus *Nitrobacter* based on comparative rep-PCR, 16S rRNA and nitrite oxidoreductase gene sequence analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 30: 297-308.
- Verchot, L.V., Holmes, Z., Mulon, L., Groffman, P.M., and Lovett, G.M. (2001) Gross vs net rates of N mineralization and nitrification as indicators of functional differences between forest types. *Soil Biology & Biochemistry* 33: 1889-1901.
- Vitousek, P.M., Mooney, H.A., Lubchenco, J., and Melillo, J.M. (1997) Human domination of Earth's ecosystems. *Science* 277: 494-499.
- Wagner, M., Loy, A., Nogueira, R., Purkhold, U., Lee, N., and Daims, H. (2002) Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 665-680.
- Waldrop, M.P., and Firestone, M.K. (2006) Response of microbial community composition and function to soil climate change. *Microbial Ecology* 52: 716-724.
- Wallenstein, M.D., and Vilgalys, R.J. (2005) Quantitative analyses of nitrogen cycling genes in soils. *Pedobiologia* 49: 665-672.
- Wang, X.B., Cai, D.X., Hoogmoed, W.B., Oenema, O., and Perdok, U.D. (2007) Developments in conservation tillage in rainfed regions of North China. *Soil & Tillage Research* 93: 239-250.
- Webster, G., Embley, T.M., Freitag, T.E., Smith, Z., and Prosser, J.I. (2005) Links between ammonia oxidizer species composition, functional diversity and nitrification kinetics in grassland soils. *Environmental Microbiology* 7: 676-684.
- Weisskopf, L., Fromin, N., Tomasi, N., Aragno, M., and Martinoia, E. (2005) Secretion activity of white lupin's cluster roots influences bacterial abundance, function and community structure. *Plant and Soil* 268: 181-194.

- Wertz, S., Poly, F., Le Roux, X., and Degrange, E. (2008) Development and application of a PCR-denaturing gradient gel electrophoresis tool to study the diversity of Nitrobacter-like nxrA sequences in soil. *Fems Microbiology Ecology* 63: 261-271.
- Wertz, S., Degrange, V., Prosser, J.I., Poly, F., Commeaux, C., Guillaumaud, N., and Le Roux, X. (2007) Decline of soil microbial diversity does not influence the resistance and resilience of key soil microbial functional groups following a model disturbance. *Environmental Microbiology* 9: 2211-2219.
- Wertz, S., Degrange, V., Prosser, J.I., Poly, F., Commeaux, C., Freitag, T. et al. (2006) Maintenance of soil functioning following erosion of microbial diversity. *Environmental Microbiology* 8: 2162-2169.
- Wick, B., Tiessen, H., and Menezes, R.S.C. (2000) Land quality changes following the conversion of the natural vegetation into silvo-pastoral systems in semi-arid NE Brazil. *Plant and Soil* 222: 59-70.
- Williams, B.L., Grayston, S.J., and Reid, E.J. (2000) Influence of synthetic sheep urine on the microbial biomass, activity and community structure in two pastures in the Scottish uplands. *Plant and Soil* 225: 175-185.
- Zaman, M., Matsushima, M., Chang, S.X., Inubushi, K., Nguyen, L., Goto, S. et al. (2004) Nitrogen mineralization, N<sub>2</sub>O production and soil microbiological properties as affected by long-term applications of sewage sludge composts. *Biology and Fertility of Soils* 40: 101-109.
- Zeller, V., Bardgett, R.D., and Tappeiner, U. (2001) Site and management effects on soil microbial properties of subalpine meadows: a study of land abandonment along a north-south gradient in the European Alps. *Soil Biology & Biochemistry* 33: 639-649.
- Zeller, V., Bahn, M., Aichner, M., and Tappeiner, U. (2000) Impact of land-use change on nitrogen mineralization in subalpine grasslands in the Southern Alps. *Biology and Fertility of Soils* 31: 441-448.
- Zhang, J.B., Song, C.C., and Wang, S.M. (2007) Dynamics of soil organic carbon and its fractions after abandonment of cultivated wetlands in northeast China. *Soil & Tillage Research* 96: 350-360.
- Zumft, W.G. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61: 533-+.

# **Annexes**

## **ANNEXE 1 : PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES ISSUES DE LA THESE**

### **I- Valorisation des résultats sous forme de publications**

#### **Acceptées :**

1. How do grassland management history and bacterial micro-localisation affect the response of bacterial community structure to changes in aboveground grazing regime?

**Attard E**, Degrange V, Klumpp K, Richaume A, Soussana JF and X. Le Roux

SOIL BIOLOGY & BIOCHEMISTRY Volume: 40 Issue: 5 Pages: 1244-1252 Published: MAY 2008

2. Effects of aboveground grazing on coupling among nitrifier activity, abundance and community structure

Le Roux X, Poly F, Currey P, Commeaux C, Hai B, Nicol JW, Prosser JI, Schloter M,

**Attard E** and K. Klumpp.

ISME JOURNAL Volume: 2 Issue: 2 Pages: 221-232 Published: FEB 2008

#### **Soumis à Environmental Microbiology:**

1. Response of *Nitrobacter*-like nitrite oxidizers to changes in tillage practices and link with nitrite oxidation activity.

**E. Attard**, F. Poly, F. Laurent, C. Commeaux, S. Recous & X. Le Roux

#### **En préparation**

1. Soil environmental variables rather than denitrifiers abundance and diversity drive the potential denitrification after changes in land-use and tillage practices.

**E. Attard**, S. Recous, F. Laurent, A. Chabbi, B. Schmid, & X. Le Roux

2. Dynamique de l'azote et du carbone dans un sol sous culture et sous prairie, et effets à court terme du changement de mode d'occupation.

**E. Attard**, X. Le Roux, F. Laurent, G. Lemaire, O. Delfosse, N. Guillaumaud, G. Alavoine & S. Recous

3. How do components of global change and their interactions affect soil *Nitrobacter*-like nitrite oxidizers in mediterranean grasslands?

Tourna M., Henry C., Niboyet A., **Attard E.**, Barthes L., Commeaux C., Field C., Guillaumaud N., Hungate B., Leadley P., Poly F. & Le Roux X. 2008. *[publication pour laquelle j'ai aidé la post doc première auteur à mettre en œuvre les outils de PCRq et PCR-DGGE ciblant les nitratants]*

## **II-Valorisation des résultats dans des congrès internationaux**

**1. E. Attard**, S. Recous, F. Poly, N. Guillaumaud, F. Laurent, E. Grehan and X. Le Roux. 2007. Temporal changes in the activity and genetic structure of the Nitrite Oxidizing Bacteria community after changes in tillage practices. 9<sup>th</sup> Symposium of Bageco, Wernigerode (Germany). Poster.

**2. E. Attard**, X. Le Roux, N. Guillaumaud, F. Poly, S. Recous. 2007. Impacts of land-use on the soil C pools and denitrifying community: the case of grassland/arable crop conversion. International Symposium on organic matter dynamics in agrosystems. Poitiers (France).Poster. Price for best posters.

**3. C. Henry**, A. Niboyet, F. Poly, **E. Attard**, C. Commeaux, N. Guillaumaud, P. Leadley, C. Field, L. Barthes & X. Le Roux. 2007. How do components of climate change and their interactions affect soil nitrite-oxidizers in grasslands? 2<sup>nd</sup> Conference Rhizosphere. Montpellier (France). Poster.

**4. S. Recous**, **E. Attard**, X. Le Roux, G. Lemaire, E. Gréhan, C. Leonard, A. Chabbi, X. Charrier. 2007. Responses of C and N fluxes and microbial characteristics to changes in land management. 15<sup>th</sup> Nitrogen Workshop. Lleida (Spain). Poster.

**5. P. Leterme**, F. Poly, **E. Attard**, C. Commeaux, K. Klumpp, G. Nicol, J.I. Prosser, X. Le Roux. 2006. Coupling between changes in the activity, size and composition of nitrifying community in grassland soil after changes in grazing regime. 11th International Symposium on Microbial Ecology, ISME Vienna (Austria). Oral presentation.

**6. E. Attard**, V. Degrange, K. Klumpp, A. Richaume, J.F. Soussana, and X. Le Roux. 2005. Resistance and resilience of the diversity of bacterial community after changes in grazing



regime in different microhabitats of grassland soil. International workshop on development and control of functional diversity at micro and macro-scales, Munich (Germany). Poster.

**7. E. Attard**, V. Degrange, K. Klumpp, A. Richaume, J.F. Soussana, and X. Le Roux. 2005. Resistance and resilience of the genetic structure of soil eubacterial community of grasslands after changes in grazing regime. 8<sup>th</sup> Symposium of Bageco (Bacterial Genetics and Ecology), Lyon (France). Poster.

**8. X. Le Roux**, P. Leterme, **E. Attard**, V. Degrange, K. Klumpp, F. Poly, J. I. Prosser & F. Teyssonneyre. 2005. Alteration and resilience of the nitrifying community following changes in grazing regime in grassland soil. 8<sup>th</sup> Symposium of Bageco (Bacterial Genetics and Ecology), Lyon (France). Oral presentation.

### **III- Valorisation des résultats dans des congrès français**

**1. E. Attard**, S. Recous, F. Poly, N. Guillaumaud, F. Laurent, E. Grehan and X. Le Roux. 2007. Résistance et résilience des communautés microbiennes du sol face aux changements du mode de gestion des agro-écosystèmes. Rencontres du département INRA Ecologie des Forêts, des Prairies et des milieux Aquatiques. Nouan-le-Fuzelier (France). Présentation orale.

**2. E. Attard**, S. Recous, F. Poly, N. Guillaumaud, F. Laurent, E. Grehan and X. Le Roux. 2007. Cinétiques des changements de l'activité et de la structure génétiques de la communauté des nitrifiants après des changements de pratiques de labour. 3<sup>e</sup> Colloque d'Ecologie Microbienne. La Grande Motte (France). Poster.

**3. E. Attard**, V. Degrange, K. Klumpp, A. Richaume, J.F. Soussana, and X. Le Roux. 2005. Effets des changements de mode de pâturage sur la structure génétique de la communauté bactérienne totale. 2<sup>nd</sup> Colloque d'Ecologie Microbienne, Obernai (France). Présentation orale.

**4. E. Attard**, V. Degrange, K. Klumpp, A. Richaume, J.F. Soussana, and X. Le Roux. 2005. Effets des changements de mode de pâturage sur la structure génétique de la communauté bactérienne. 7<sup>èmes</sup> Journées d'Ecologie Fonctionnelles, Super Besse (France). Poster.

**5.** X. Le Roux, **E. Attard**, A. Clays, C. Commeaux, V. Degrange, N. Guillaumaud, P. Leterme, A. K. Patra, F. Poly & A. Richaume. 2005. Impact de perturbations anthropiques sur les communautés microbiennes du sol. 7ème Journées d'Ecologie Fonctionnelles, Super Besse (France). Présentation orale.

**ANNEXE 2 : ARTICLE ANALYSANT LA REPONSE DE LA NITRIFICATION ET  
DES NITRITANTS APRES CHANGEMENT DU REGIME DE PATURAGE EN  
PRAIRIE**

Les objectifs de ce travail auquel j'ai participé en réalisant les prélèvements de sol et les extractions des ADN des échantillons ont été :

- (i) de comparer la vitesse et l'amplitude des changements d'activité d'abondance et de structure de la communauté nitrifiante (AOB et AOA) pendant 2 années après des changements de mode de pâturage, tout en testant l'hypothèse qu'appliquer une perturbation sur un système initialement non perturbé conduirait à une réponse plus rapide que l'arrêt d'une perturbation sur un système déjà perturbé.
- (ii) d'évaluer dans quelle mesure les changements de la structure et de l'abondance de la communauté nitrifiante pouvaient expliquer les changements d'activité et notamment s'il fallait tout d'abord qu'un changement de structure se produise pour observer un changement de l'activité comme cela avait été observé précédemment par Webster et al. (2005).
- (iii) d'évaluer l'effet des gestions passé et actuelle sur l'activité, l'abondance et la structure de la communauté nitrifiante 2 ans après les changements de mode de pâturage.

Cette étude a été réalisée à partir des mêmes microcosmes de sol qui ont servi à l'étude présentée dans le chapitre 2.

J'ai utilisé certains des résultats de cette étude dans le sixième chapitre de ma thèse, partie de synthèse des résultats (notamment dans les figures).

Cette étude a permis de démontrer:

- (i) que les AOB et AOA étaient rapidement affectés par les changements de pâturage
- (ii) que préalablement à l'augmentation de la nitrification après l'application du pâturage, la sélection de certaines populations d'AOB était nécessaire.
- (iii) que la baisse de la nitrification suite à l'arrêt du pâturage était probablement due à une baisse des effectifs des nitrifiants et à une baisse du substrat azoté
- (iv) que l'activité et les effectifs des AOB et AOA étaient contrôlés par la nouvelle en 12 mois.

(v) la structure des AOB était sous l'effet de l'ancienne et de la nouvelle gestion, démontrant le découplage pouvant exister entre la fonction et la diversité d'une communauté bactérienne.



## ORIGINAL ARTICLE

# Effects of aboveground grazing on coupling among nitrifier activity, abundance and community structure

Xavier Le Roux<sup>1</sup>, Franck Poly<sup>1</sup>, Pauline Currey<sup>1,5</sup>, Claire Commeaux<sup>1</sup>, Brigitte Hai<sup>2</sup>, Graeme W Nicol<sup>3</sup>, James I Prosser<sup>3</sup>, Michael Schloter<sup>2</sup>, Eléonore Attard<sup>1</sup> and Katja Klumpp<sup>4</sup>

<sup>1</sup>INRA, CNRS, Université de Lyon, Université Lyon 1, UMR 5557 Ecologie Microbienne, Villeurbanne, France;

<sup>2</sup>GSF National Research Center for Environment and Health, Institute of Soil Ecology, Neuherberg, Germany;

<sup>3</sup>School of Biological Sciences, University of Aberdeen, Aberdeen, UK and <sup>4</sup>Unité d'Agronomie INRA, Clermont Ferrand, France

**The influence of switches in grassland management to or from grazing on the dynamics of nitrifier activity, as well as the abundance of ammonia-oxidizing bacteria, AOB and ammonia-oxidizing archaea, AOA, was analyzed for two years after changing management. Additionally nitrifier community structure of AOB was surveyed. Four treatments were compared in mesocosms: grazing on previously grazed grassland (G-G); no grazing on ungrazed grassland (U-U); grazing on ungrazed grassland (U-G) and cessation of grazing on grazed grassland (G-U). Nitrifier activity and abundance were always higher for G-G than U-U treatments and AOB community structure differed between these treatments. AOA abundance was in the same range as AOB abundance and followed the same trend. Grazing led to a change in AOB community structure within <5 months and a subsequent (5–12 months) increase in nitrifier activity and abundance. In contrast, cessation of grazing led to a decrease in nitrifier activity and abundance within <5 months and to a later (5–12 months) change in AOB community structure. Activity in G-U and U-G was similar to that in U-U and G-G, respectively, after 12 months. Sequence analysis of 16S rRNA gene clones showed that AOB retrieved from soils fell within the *Nitrosospira* lineage and percentages of AOB related to known *Nitrosospira* groups were affected by grazing. These results demonstrate that AOB and AOA respond quickly to changes in management. The selection of nitrifiers adapted to novel environmental conditions was a prerequisite for nitrification enhancement in U-G, whereas nitrification decrease in G-U was likely due to a partial starvation and decrease in the abundance of nitrifiers initially present. The results also suggest that taxonomic affiliation does not fully infer functional traits of AOB.**

*The ISME Journal* (2008) 2, 221–232; doi:10.1038/ismej.2007.109; published online 29 November 2007

**Subject Category:** microbial ecology and functional diversity of natural habitats

**Keywords:** ammonia oxidizers; ammonia-oxidizing bacteria; ammonia-oxidizing archaea; herbivory; microbial diversity–functioning relationship; nitrogen cycle

## Introduction

In grasslands, soil N cycling can be promoted by aboveground grazing pressure (Ruess, 1986; McNaughton *et al.*, 1988; Frank and Groffman, 1998; Bardgett and Wardle, 2003). Negative effects can also be observed in nutrient-poor systems or under high grazing pressure (Bardgett and Wardle,

2003). Because N is the limiting factor for primary production in many ecosystems (Vitousek and Howarth, 1991), grazing-induced enhancement of soil N dynamics is a key mechanism through which herbivores can influence plant productivity in such a way as to alleviate nutritional deficiencies (McNaughton *et al.*, 1997; Leriche *et al.*, 2001). In particular, the regulation of nitrification has often been regarded as the key for an efficient nitrogen cycling in this context, as in contrast to most other steps in nitrogen turnover only a limited number of microbes is able to convert ammonia into nitrate. Enhanced nitrification in response to grazing pressure has been reported in different unfertilized grassland ecosystems (Groffman *et al.*, 1993; Frank *et al.*, 2000; Le Roux *et al.*, 2003; Patra *et al.*, 2005). These changes can be explained by factors such as

Correspondence: X Le Roux, INRA, CNRS, Université de Lyon, Université Lyon 1, UMR 5557 Ecologie Microbienne, USC 1193, bat G Mendel, 43 boulevard du 11 novembre 1918, Villeurbanne 69622, France.

E-mail: leroux@biomserv.univ-lyon1.fr

<sup>5</sup>Current address: Macaulay Land Use Research Institute, Craigiebuckler, Aberdeen AB15 8QH, UK.

Received 7 August 2007; revised 29 October 2007; accepted 29 October 2007; published online 29 November 2007

urine and dung input by herbivores (Ruess and McNaughton, 1987; Petersen *et al.*, 2004) and changes in competition for N between microorganisms and plants (Busso *et al.*, 2001; Hamilton and Frank, 2001). It has been further shown that grazing-induced differences in nitrification levels in grasslands are associated with changes in the abundance and community structure of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) that were thought to be the key players of the first step of nitrification: oxidation of ammonia into nitrite (Patra *et al.*, 2005, 2006). This picture has changed a little in the last years, as it could be shown that ammonia oxidation can be performed not only by AOB but also by ammonia-oxidizing archaeae (AOA) that could be detected in soil (Leininger *et al.*, 2006). However, the role of the latter group in soil N dynamics is still unclear, as factors influencing AOA and AOB abundance and activity are still missing.

Previous field studies have evaluated long-term (years to decades) effects of different grazing regimes on the nitrifier community, often assuming that it had reached a near-equilibrium state determined by the grazing regime. This traditional assumption of near-equilibrium conditions is often divorced from reality, because demographic and socio-economic constraints can lead to management intensification, de-intensification or abandonment in grazed grasslands at timescales much shorter than decades. Studies are thus needed to analyze the kinetics of the response of soil nitrifiers following changes in grazing regime. Such studies could provide insights into the coupling between grazing-induced changes in nitrification and concurrent changes in nitrifier abundance and community structure.

The objectives of this study and associated assumptions were:

- (1) to compare the speed and extent of changes in the activity, abundance and community structure of nitrifiers for two years after switches in grassland management to or from grazing, testing the hypothesis that disturbance of a previously undisturbed system would lead to a faster response than cessation of disturbance of a previously disturbed system;
- (2) to assess the ability of changes in the community structure and abundance of nitrifiers to explain observed changes in nitrification under these two scenarios, in particular whether changes in nitrification levels first required changes in nitrifier community structure as suggested by Webster *et al.* (2005) and
- (3) to evaluate the relative importance of past and current grazing regimes on the activity, abundance and community structure of nitrifiers two years after a change in grazing regime.

Two levels of management intensity, no grazing and intensive grazing, were investigated in mesocosms initially derived from grazed and un-

grazed grasslands. Four treatments were compared: (i) grazing applied on previously grazed grassland, (ii) no grazing on previously ungrazed grassland, (iii) application of grazing on previously ungrazed grassland and (iv) cessation of grazing on previously grazed grassland. The abundance of AOB and AOA, and the community structure of AOB were surveyed over 2 years. In addition, the dominant AOB phylotypes in the four treatments after 18 months were characterized by cloning and sequencing. Mechanisms explaining the observed kinetics of changes in activity, abundance and community structure of nitrifiers under the grazing application and grazing cessation scenarios are discussed according to current knowledge of nitrifier ecology.

## Materials and methods

### *Experimental design*

In May 2002, grassland monoliths (that is intact soil and plant cover) were sampled from a seminatural grassland located at Theix (France; 3°1'E, 45°43'N). This grassland had been subjected, in a randomized block design, to two contrasted sheep grazing/mowing regimes without inorganic fertilization from 1988 to 2003. Half of the plots had experienced intensive grazing/mowing (four grazing events and one cut per year), while half had experienced light grazing by sheep (one event per year). Basic soil characteristics (including texture and pH) and climate were the same between both plots (Le Roux *et al.*, 2003). Excavated monoliths (104 monoliths; 52 for each plot, size 50 cm × 50 cm, 40 cm deep) were placed in five-sided stainless steel boxes with drainage holes at the bottom. Two simulated grazing regimes were then applied to these grassland mesocosms for 1 year before beginning the experiment (Appendix 1 in Supplementary information), either no grazing (ungrazed U treatment) or grazing (G treatment), which consisted of plant clipping to 5 cm above the soil surface and application of synthetic sheep urine five times per year to mesocosms derived from the intensively managed plot. Urine was prepared as described by Doak (1952), with a total N content of 0.7 g N l<sup>-1</sup>, including urea (1.12 g l<sup>-1</sup>), hippuric acid (0.42 g l<sup>-1</sup>), allantoin (0.18 g l<sup>-1</sup>) and creatinine (0.09 g l<sup>-1</sup>) and with pH adjusted to 7 with NaOH. For each simulated grazing event, urine was applied uniformly to the soil surface and at a level chosen such that N as urine represented 80% of N exported by clipped plant material, which is typical of the N budget in these grazed grasslands under field conditions. Soil moisture was monitored and kept around 35–40% (ca. 70% of water holding capacity). After 1 year, that is in late April 2003, eight mesocosms (four grazed and four ungrazed) were sacrificed at the start of the experiment. At the same date, grazing regime was reversed for half of the remaining mesocosms (that is 24 grazed mesocosms were

submitted to a reversion of grazing regime, from grazing to no grazing treatment, G-U; and 24 ungrazed mesocosms were submitted to the reciprocal change from no grazing to grazing treatment, U-G). Grazing regime was left unchanged for the 48 remaining mesocosms (that is 24 grazed controls, G-G; and 24 ungrazed controls, U-U). Details on the frequency of simulated grazing events in each treatment are provided in Appendix 1 in Supplementary information.

#### Soil sampling

Soil was sampled before reversion of grazing regime (April 2003) and after 1.5 (June 2003), 4.5 (September 2003), 12 (April 2004), 18 (September 2004) and 24 months (April 2005). Soil was sampled at least 1 month after the last simulated grazing event (Appendix 1 in Supplementary information). At each sampling date, four mesocosms per treatment (four G-G and four U-U in April 2003, and then four G-G, four U-U, four G-U and four U-G at each date) were destructively sampled. The 0–10 cm soil layer was sampled on a 10 cm × 40 cm area in the inner part of each mesocosm and sieved (2 mm mesh size). A 50-g subsample was used for measurement of nitrifier activity and a subsample was stored at –18 °C for molecular analysis.

#### Determination of nitrifier activity

Nitrifier activity was measured according to the method proposed by Lensi *et al.* (1986), in which soil nitrate is measured before and after soil incubation by conversion to N<sub>2</sub>O by denitrification. We have previously shown for this soil that this approach to measure nitrate accumulation gives similar results than traditional extraction-colorimetry method but with a higher sensitivity (S Wertz and X Le Roux, unpublished). For each fresh soil sample, two subsamples (equivalent to 10 g oven-dried soil) were placed in 150 ml plasma flasks. One subsample was used to estimate initial soil nitrate content. The atmosphere of this flask was replaced by a 90:10 He–C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> mixture and was supplied with a suspension of the denitrifying organism *Pseudomonas fluorescens* (OD<sub>580 nm</sub> = 2) in a solution containing water, glucose and glutamic acid (each at 1 mg C g<sup>-1</sup> dry soil). N<sub>2</sub>O accumulation was surveyed until NO<sub>3</sub><sup>-</sup> was fully converted to N<sub>2</sub>O. The other subsample was used to determine NO<sub>3</sub><sup>-</sup> accumulation after addition of a solution containing water and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (200 µg N g<sup>-1</sup> dry soil) to obtain 80% of the water holding capacity. The flask was sealed with parafilm and incubated aerobically at 28 °C. After incubation for 7 h, the soil subsample was enriched with *P. fluorescens* and incubated as described above to convert nitrate fully to N<sub>2</sub>O. During methodological tests, nitrification rate was found to be constant during the first 7 h for this soil. N<sub>2</sub>O was analyzed on a Varian STAR 3400 gas

chromatograph. Nitrifying activity (µg N h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> dry soil) was computed by subtracting the nitrate content initially present in the soil from that present after incubation.

#### Quantification of AOB and AOA abundances

The abundance of β-proteobacterial AOB, that is representing known AOB in soil, was measured by quantitative PCR (qPCR) targeting 16S rRNA gene sequences specific for this group (Hermansson and Lindgren, 2001). The final reaction volume was 25 µl, with iQSupermix (Bio-Rad), 1 µM of a 2:1 ratio of primer CTO189fA/B and CTO189fC, 1 µM of RT1r primer, 0.5 µM of TPM1probe, 0.4 mg ml<sup>-1</sup> bovine serum albumin (BSA), 10 ng of sample DNA or 5.72 × 10<sup>8</sup>–5.72 × 10<sup>2</sup> copies of the standard DNA (purified AOB 16S rRNA gene PCR product of ATCC19718 *Nitrosomonas europaea*). The samples were run twice on Opticon2 (MJ Research, Waltham, MA, USA) as follows: 3 min at 95 °C, 45 cycles at 95 °C for 15 s and 58 °C for 1 min, and 8 min at 56 °C. No treatment effect was observed on amplification efficiency. To control possible PCR inhibition by material from environmental samples, each standard concentration was co-amplified with several dilutions of pooled samples, but no inhibition was observed.

The abundance of AOA was measured by qPCR targeting archaeal *amoA* gene. Fragments (624 bp) were obtained using the primer set 19F (Leininger *et al.*, 2006) and CrenamoA616r48x (5'-gccatccabckr tangtcca-3'), which was designed on the basis of all available soil-derived AOA *amoA* sequences in GenBank in November 2006 (S Leininger, personal communication). Each 25 µl reaction mixture contained 0.06% BSA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 5 pmol of each primer (Metabion, Bayern, Germany), × 1 Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and 2 µl of DNA template or standard, respectively. The PCR reactions were carried out on the ABI Prism 7300 Cyclor (Applied Biosystems) performing an initial enzyme activation at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 94 °C for 45 s, 50 °C for 45 s and 72 °C for 45 s. As standard, a serial dilution of the crenarchaeal fosmid clone 54d9, described in Treusch *et al.* (2005), was used. Melting curve analysis confirmed the specificity of the amplification, whereas amplification efficiencies of 82–89% were obtained. Possible inhibitory effects of co-extracted humic compounds in soil extracts were checked by dilution series, but no inhibition was observed.

#### Characterization of the structure of the AOB community

For each sample, DNA was extracted from 0.5 g sieved and frozen soil using the FastDNA SPIN Kit for Soil (BIO 101 Systems; Qbiogene, Carlsbad, CA, USA) yielding approximately 6 µg DNA g<sup>-1</sup> soil. The



AOB community structure was characterized at five of the six sampling dates: 0, 4.5, 12, 18 and 24 months (that is 72 samples), and was analyzed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Amplification of 16S rRNA gene fragments from extracted soil DNA was achieved by primary amplification with CTO189f and CTO654r primers (Kowalchuk *et al.*, 1997) that are specific for the majority of  $\beta$ -proteobacterial AOB, and with a secondary nested amplification using bacterial 357f-GC and 518r primers (Muyzer *et al.*, 1993). CTO and bacterial primers amplified 465- and 161-bp fragments, respectively. PCR was carried out in 20 and 50  $\mu$ l reaction volumes for primary and secondary amplifications, respectively, with a Biometra thermal cycler (Goettingen, Germany). The reaction mixture contained 8 ng of template DNA, 0.2 and 0.1  $\mu$ M of each primer for the first and second PCR, respectively, 1  $\times$  PCR buffer (Bioline, London, UK), 250  $\mu$ M deoxynucleoside triphosphate, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 ng BSA for the first PCR only, and 0.016 U  $\mu$ l<sup>-1</sup> of Biotaq DNA polymerase (Bioline). The thermocycling conditions were modified from Freitag and Prosser (2003): 28 cycles instead of 35 for the second PCR and a final elongation time of 10 min for each PCR. The PCR products were examined by electrophoresis on 2% agarose gels (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) stained with ethidium bromide. DGGE analysis of PCR products was carried out using the D-Code Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) with 8% polyacrylamide gels containing a gradient of 30–60% denaturant, prepared using a gradient maker (Roth, Karlsruhe, Germany), 100% denaturing solution being defined as 7 M urea and 40% formamide. Gels were run for 16 h at 75 V in 1  $\times$  Tris acetate EDTA (TAE) buffer at 60 °C. Following electrophoresis, gels were silver stained and photographed with a digital camera (Sony DSC-F77).

#### *Characterization of major AOB phylotypes by cloning–sequencing*

The major AOB phylotypes present in each treatment 18 months after the change in grazing regime were determined by cloning and sequencing. Clone libraries were generated from PCR products obtained by amplification with CTO189f and CTO654r primers from all the soils sampled after 18 months, that is four replicate monoliths for each of the four treatments. Cloning was carried out using the pGEM T-Easy vector system (Promega Ltd, Southampton, UK) and JM109 supercompetent *Escherichia coli* cells (Stratagene Inc., Maidstone, UK) and 26–27 clones, randomly selected from each per soil sample (total of 418 clones), were sequenced (Genome Express, Meylan, France).

Sequences were aligned with partial AOB 16S rRNA gene sequences previously published and used to define phylogenetic groups (Appendix 2 in Supplementary information) using Muscle align-

ment of SeaView software (Galtier *et al.*, 1996). Phylogenetic analysis was performed using three treeing methods: (i) parsimony method, (ii) neighbor joining method with Jukes and Cantor model of substitution and (iii) maximum likelihood tree, using four categories of substitutions with an estimated gamma distribution parameter and JC69 model of substitution. The first two methods were performed with Phylowin software (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/phylowin.html>) (Galtier *et al.*, 1996), while the third method was performed with Phyml software (<http://atgc.lirmm.fr/phyml/>) (Guindon and Gascuel, 2003). Then a consensus tree was computed with Consense in the PHYLIP package 3.66 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). The consensus tree was visualized using NJ plot (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/njplot.html>) (Perriere and Gouy, 1996)). For each monolith, the percentage of AOB phylotypes belonging to the main AOB phylogenetic clusters identified in the literature (Stephen *et al.*, 1996; Purkhold *et al.*, 2000; Koops and Pommerening-Röser, 2001; Kowalchuk and Stephen, 2001; Wagner *et al.*, 2002) was determined. Sequences obtained in this study have been deposited in the GenBank database (Appendix 2 in Supplementary information).

#### *Data analysis*

Two-factor analysis of variance was performed to determine the effects of grazing treatment, time and grazing  $\times$  time interaction on the activity and abundance of nitrifiers. For each variable, Duncan's and Fisher's tests were then used to determine if means differed significantly between treatments at each date. The effect of grazing treatment on the percentage of AOB phylotypes related to previously defined AOB phylogenetic groups was also tested using Duncan's and Fisher's tests.

To analyze genetic fingerprints, the intensity and relative position of each DNA band in all lanes were determined according to a reference lane using GelCompar software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). The total band intensity for each lane was normalized among lanes, and data were square root-transformed. Bacterial community matrices were analyzed using PRIMER software (version 2, PRIMER-E Ltd, Plymouth, UK). For each date, ANOSIM (one-way analysis of similarities) was performed to compare community structure among each pair of treatments, and the SIMPER (SIMilarity PERcentages) procedure was used to compute the percentage of dissimilarity between community structure for each pair of treatments. Changes in AOB community structure after reversion of grazing regime were quantified by determining the percentage dissimilarity of community structure between (i) soils that had experienced reversion of grazing regime and (ii) control soils under the past grazing regime (that is U-G vs U-U, and G-U vs G-G). A similar approach was adopted to determine the

effect of the new grazing regime on the structure of the AOB community.

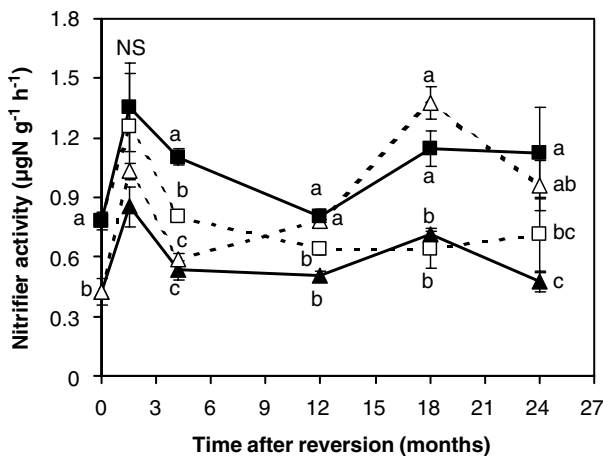
## Results

### Changes in nitrifier activity

The effects of grazing, time and grazing  $\times$  time interaction on nitrifier activity were all significant ( $P \leq 0.001$ ). Activity was always higher for G-G than U-U treatments, except 1.5 months after change in grazing regime when variance for activity values was high for G-G and G-U treatments (Figure 1). Cessation of grazing led to a rapid decrease in nitrifier activity as compared to G-G treatment (detected as soon as 4.5 months), and activity for G-U treatment became similar to that for U-U treatment after 12–18 months (Figure 1). Application of grazing did not lead to any change in nitrifier activity during the first 5 months (no change between U-G and U-U treatments). Activity then strongly increased for the U-G treatment as compared to the U-U treatment and became similar to that for the G-G treatment within  $\leq 12$  months (Figure 1).

### Changes in the abundance of AOB and AOA

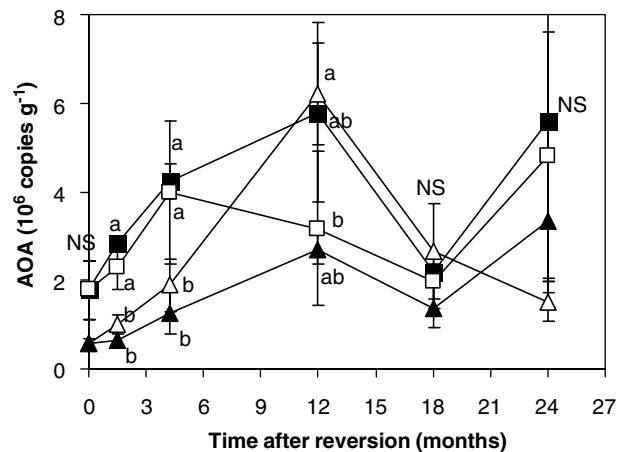
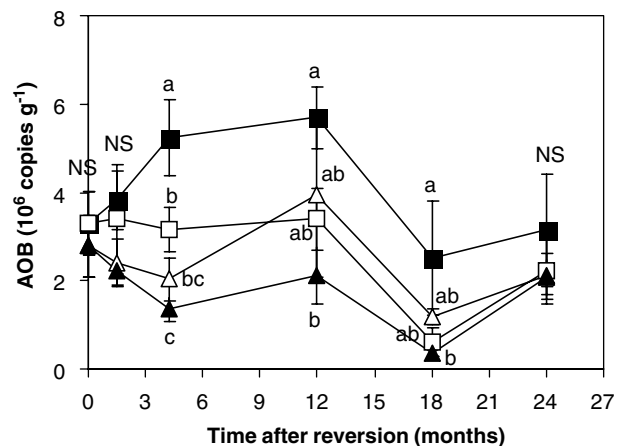
The effects of grazing and time on the abundance of AOB were significant ( $P = 0.0001$  and  $0.0005$ , respectively), whereas the effect of grazing  $\times$  time interaction was not. The abundance of AOB always tended to be higher for G-G than U-U treatments. However, due to the high variance of abundance data (Figure 2) this was significant only for 4.5, 12 and 18 months after the change in grazing regime. Cessation of grazing led to a rapid decrease in AOB abundance as compared to G-G treatment, and AOB abundance for G-U treatment became similar to that for U-U treatment within 12–18 months (Figure 2).



**Figure 1** Temporal changes in nitrifier activity in grassland mesocosms subjected to different grazing treatments: (■) grazed controls, G-G; (▲) ungrazed controls, U-U; (□) reversion from grazed to ungrazed, G-U and (△) reversion from ungrazed to grazed, U-G. Bars are standard errors ( $n = 4$ ). Values with different letters differ significantly with  $P < 0.05$ .

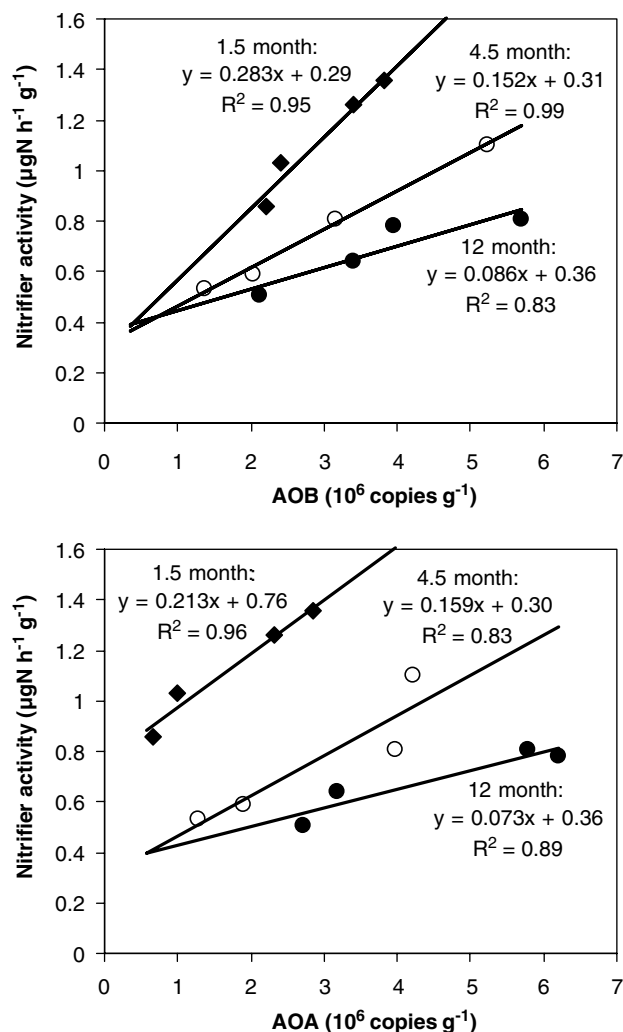
Application of grazing led to an increase in AOB abundance as compared to U-U treatment, although this increase was not significant due to large variance in abundance values (Figure 2).

Abundances of AOA and AOB were in the same order of magnitude (Figure 2), and the abundance of AOA was significantly and linearly related to that of AOB ( $y = 0.75x + 0.798$  in  $10^6$  copies  $g^{-1}$ ;  $R^2 = 0.35$ ). Interestingly, dynamics of AOA gene copy numbers were similar to the AOB abundance dynamics described above (Figure 2). Again, cessation of grazing tended to decrease AOA abundance as compared to G-G treatment after 12 months, whereas application of grazing resulted in an increase of AOA abundance as compared to U-U treatment after 12 months (Figure 2). A tendency for higher abundance of AOA in G-G than U-U treatments was observed, but this was significant only 1.5 and 4.5 months after the change in grazing regime ( $P = 0.06$  at day 0), probably due to the high variance of abundance data (Figure 2).



**Figure 2** Temporal changes in (top) abundance of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and (bottom) abundance of ammonia-oxidizing archaea (AOA), in mesocosms subjected to different grazing treatments. Symbols as in Figure 1. Bars are standard errors ( $n = 4$ ). Values with different letters differ significantly with  $P < 0.05$ .

All data were calculated on the basis of grams of soil. However, the results did not change significantly if the values were based on nanograms



**Figure 3** Correlations between nitrifier activity and (top) ammonia-oxidizing bacteria (AOB) abundance and (bottom) ammonia-oxidizing archaeae (AOA) abundance, observed 1.5 (◆), 4.5 (○) and 12 months (●) after reversion of grazing regime. Each point corresponds to mean treatment values ( $n=4$ ). Relationships for both AOB and AOA were not significant at 18 and 24 months.

extracted DNA (data not shown), indicating the robustness of the obtained results.

#### Relationships between nitrifier activity and AOB or AOA abundance

Strong correlations were observed between mean treatment values of nitrifying activity and both AOB and AOA abundances 1.5, 4.5 and 12 months after the change in grazing regime (Figure 3). At the later time points, no significant correlation was observed for AOB and AOA (data not shown).

#### Changes in AOB community structure

For each treatment, the major bands observed by DGGE analysis of amplified bacterial ammonia oxidizer 16S rRNA genes changed substantially with time (not shown), indicating dynamics of major AOB populations. However, the percentage of dissimilarity for the AOB community structures between G-G and U-U control treatments remained constant (around 50%) over 2 years (Table 1; Figure 4). Cessation of grazing did not lead to any detectable change in AOB community structure over the first 5 months (no change between G-U and G-G treatments). However, AOB community structure was strongly modified from 12 to 24 months (Table 1; Figure 4). In contrast, the application of grazing led to a rapid change in AOB community structure (detected as soon as 4.5 months) (Table 1; Figure 4).

With increasing time after change in grazing regime, AOB community structure in treatments where grazing regime had been changed did not resemble that for control treatment corresponding to the new grazing regime, that is G-U vs U-U and U-G vs G-G (Table 1; Figure 5). The only exception was for U-G treatment at 24 months, indicating that the AOB community structure at this timescale became mainly determined by the new management regime for the grazing application scenario.

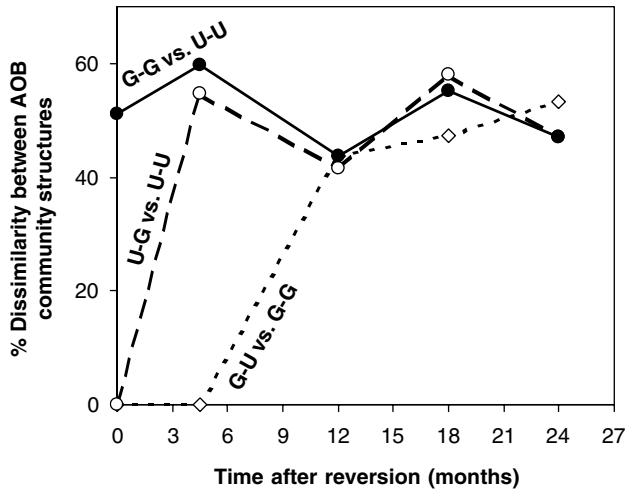
#### Relative abundance of AOB phylotypes related to different phylogenetic groups

Of the 418 retrieved partial sequences, 95% were related to previously defined  $\beta$ -proteobacterial

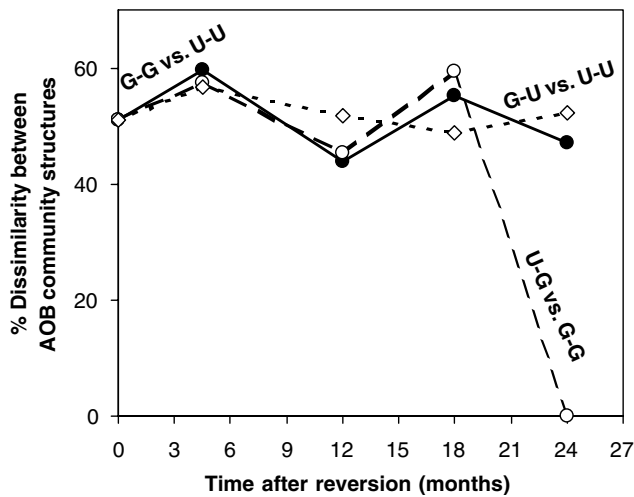
**Table 1** Results ( $P$ -values) of one-way ANOSIM for comparisons of the AOB community structure assessed by DGGE profiles between the different treatments

	Before reversion	4.5 months	12 months	18 months	24 months
U-U vs G-G	0.03	0.03	0.05	0.03	0.05
U-U vs U-G	—	0.05	0.05	0.05	0.03
G-G vs G-U	—	NS	0.05	0.03	0.03
U-G vs G-G	—	0.03	0.03	0.03	NS
G-U vs U-U	—	0.03	0.03	0.05	0.05
G-U vs U-G	—	0.03	0.03	0.03	0.05

Abbreviations: ANOSIM, analysis of similarities; AOB, ammonia-oxidizing bacteria; DGGE, denaturing gradient gel electrophoresis; G-G, grazed controls; G-U, change from grazed to ungrazed; NS, not significant; U-G, change from ungrazed to grazed; U-U, ungrazed controls.



**Figure 4** Percentage of dissimilarity between the structure of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) community in mesocosms subjected to a reversion of grazing regime and in control mesocosms subjected to the initial grazing regime, that is (○) U-G vs U-U, and (◇) G-U vs G-G. Percentage of dissimilarity between the AOB community structure in the two controls (●) is presented for comparison.



**Figure 5** Percentage of dissimilarity between ammonia-oxidizing bacteria (AOB) community structure in mesocosms subjected to reversion of grazing regime and in control mesocosms subjected to the new grazing regime, that is (○) U-G vs G-G, and (◇) G-U vs U-U. Percentage of dissimilarity between the AOB community structure in the two controls (●) is presented for comparison.

ammonia oxidizers (Appendix 3 in Supplementary information): 1 related to *Nitrosomonas*, and 396 to *Nitrosospira*. Of the 21 other sequences, 20 were affiliated to Methylophilaceae and 1 was a bacterial sequence not related to any known groups.

Of the AOB phylotypes retrieved after 18 months from G-G soils, 82% were related to *Nitrosospira* cluster 3a, whereas the AOB phylotypes retrieved from U-U soils were distributed in clusters 0, 3a, 3b and 4 (15–39% for each cluster) (Figure 6). Cessation

of grazing led to a significant decrease in the relative abundance of AOB phylotypes related to cluster 3a (G-U as compared to G-G treatment), whereas a marginally significant increase in the relative abundance of phylotypes related to clusters 0 and 4 was observed (Figure 6). Application of grazing led to a significant decrease in the relative abundance of AOB phylotypes related to cluster 3b (U-G as compared to U-U treatment), whereas a marginally significant increase in the relative abundance of phylotypes related to cluster 0 was observed.

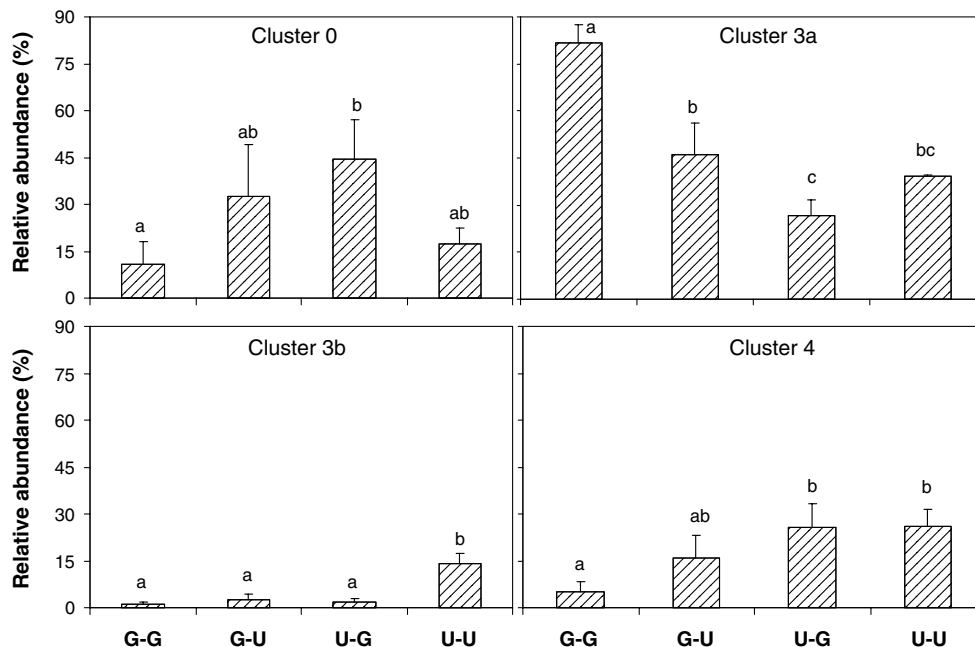
## Discussion

*Differences in nitrifier activity, AOB/AOA abundance and AOB community structure between control grazed and ungrazed mesocosms*

Nitrifier activity, AOB and AOA abundances, and AOB community structure exhibited important variations with time. Important temporal variations in nitrifying activity and abundance of AOB have already been reported in grassland and cropping systems (Berg and Rosswall, 1987). In such systems, this could be due to multiple forcings by disturbance regime, climate and plant physiology and phenology acting at a range of scales. However, the activity and abundance of nitrifiers were always higher on G-G than U-U soils and AOB community structure always differed between these treatments throughout the 24-month period studied. Previous analyses of grazing effects on AOB communities in grasslands were generally based on snapshot characterization at only one or two times (Webster *et al.*, 2002; Patra *et al.*, 2005). Comparison of G-G and U-U treatments show that grazing-induced enhancement of nitrifier activity and of both AOB and AOA abundances was remarkably conserved with time. Similarly, a high grazing-induced difference in AOB community structure was maintained between grazed and ungrazed conditions, despite changes in relative abundance of dominant AOB phylotypes for a given grazing regime with time. The data therefore indicate that, despite temporal variations, the effect of grazing on nitrifiers was remarkably stable from a functional rather than structural point of view.

*Importance of changes in AOB and AOA abundance and AOB community structure for changes in nitrification after change in grazing regime*

It was hypothesized that disturbance of a previously undisturbed system would lead to a faster response than suppression of disturbance on a previously disturbed system. The observed responses were actually more subtle because nitrifier activity responded even more quickly to cessation of grazing (within <5 months) than to application of grazing (5–12 months). The temporal changes in nitrifier activity after change in grazing regime could result from (i) changes in nitrifier abundance, (ii) changes



**Figure 6** Relative abundances of partial ammonia-oxidizing bacteria (AOB) sequences retrieved from soils experiencing the four grazing treatments, 18 months after change in grazing regime, as related to different *Nitrosospira* groups defined in the literature. Relative abundance of sequences related to cluster 2 was always  $< 3\%$  without significant grazing effect. Means of four replicates (mesocosms) are presented with standard errors. Values with different letters differ significantly with  $P < 0.05$ .

in the physiological activity of individual nitrifying organisms (that is mean activity per cell) and/or (iii) changes in nitrifier community structure. AOB and AOA abundances were measured by qPCR, so that results were not influenced by cultivation biases that can be high (Kowalchuk *et al.*, 2000; Phillips *et al.*, 2000a, b). Because all known  $\beta$ -proteobacterial ammonia oxidizers are thought to carry only a single 16S rRNA gene per genome (Kowalchuk and Stephen, 2001; see also genome data available for *N. europaea* ATCC19718, *N. eutropha* C91 and *Nitrosospira multififormis* ATCC25196), the measured gene copy numbers should be close to cell numbers for AOB. Similarly, based on the existing data for AOA (Könneke *et al.*, 2005; Treusch *et al.*, 2005) it can be assumed that per organism only one *amoA* copy exists. Thus, the measured AOA *amoA* gene copy numbers should be close to the cell numbers for AOA. For both grazing application and grazing cessation scenarios, changes in nitrifier activity were strongly correlated with changes in the abundance of both AOB and AOA, at least during the first 12 months. The relationship between activity and AOB abundance is consistent with the correlations obtained between nitrification levels and the abundance of cultivable AOB at the same study sites under field conditions (Patra *et al.*, 2005). Similarly, strong correlations were obtained between nitrification and the abundance of AOB assessed by qPCR in salt marsh sediments (Dollhopf *et al.*, 2005), among various soil depths in arable cropping systems (Berg and Rosswall, 1987), and in soil amended with or without ammonium

(Hesselsøe *et al.*, 2001) (but see Mendum *et al.*, 1999; Phillips *et al.*, 2000a; Wheatley *et al.*, 2003). Whereas some data have been available on the expected behavior of AOB, almost no results have been published so far on abundance of AOA in grassland soils and possible interaction with grazing. The data published so far has shown a higher abundance of AOA to AOB (Leininger *et al.*, 2006; He *et al.*, 2007). However, it has been shown in these studies that in deeper soil layers the AOA/AOB ratio increases, which may be an indication that AOA/AOB ratio increases with increased nutrient limitation. This could explain that AOA abundance was comparable to AOB abundance in the fertile grasslands studied here. Given that transformation rates for ammonium into nitrite by AOA is currently assumed to be lower than for AOB (Könneke *et al.*, 2005), it can be postulated that the major part of nitrification in the investigated grassland soils was related to AOB activity.

Application of grazing led first (within  $< 5$  months) to a change in AOB community structure, with subsequent increases in activity and abundance. The timescale for the grazing-induced change in the structure of the AOB community is consistent with conclusions of Avrahami *et al.* (2003) that changes in the AOB community structure can be detected a few weeks after addition of a fertilizer or urea-amended slurry. Given that particular AOB populations can be selected under high- vs low-ammonia conditions (Kowalchuk and Stephen, 2001) and that urine input leads quickly to increased  $\text{NH}_3$  availability in grassland soil (Luo *et al.*, 1999),

changes in ammonia availability were likely the key factor explaining the observed changes in AOB community structure for U-G treatment. This is consistent with results of Patra *et al.* (2006) who observed that grazing-induced changes in ammonia availability explained changes in nitrifier activity and community structure at these study sites under field conditions. Furthermore, the preliminary shift in community structure observed before any change in activity is consistent with results reported by Webster *et al.* (2005), who observed that, in natural, ungrazed soils, a change in AOB community structure was often required before enhancement of nitrification following sheep urine application. The authors suggested that, when AOB communities were dominated by strains sensitive to high ammonia concentration, a shift toward ammonia-tolerant AOB populations was needed to allow nitrification increase. Our results show that, under more realistic conditions (that is planted grassland soils experiencing both urine addition and plant defoliation events), selection of particular nitrifying populations adapted to the new environmental conditions, in particular persistent high urea supply, was a prerequisite for nitrification enhancement in the U-G treatment. Characterization of the physiological traits of dominant AOB populations under grazing vs no grazing conditions, particularly their sensitivity to urea/ammonia levels, is thus a priority. The ability to produce urease that is not encountered in all AOB (Koops and Pommerening-Röser, 2001) could also be an important physiological attribute in this context.

In contrast, cessation of grazing led first (within <5 months) to a decrease in nitrifier activity and AOB abundance, and only later to a change in community structure. Similarly, Griffiths *et al.* (2003) reported important physiological effects of water stress on the activity of microbial community in grassland soil without any detectable effect on the structure of the microbial community. Thus, the decrease in nitrification observed early for the G-U treatment was likely due to partial starvation and decrease in the abundance of AOB initially present.

For both G-U and U-G treatments, nitrifier activity became similar to that observed for control treatments corresponding to the new grazing regime after ca. 12 months. In contrast, this was not observed for the community structure, except for U-G treatment after 24 months. This shows that similar nitrifier activity can be insured by AOB communities differing in their community structure, which is consistent with the high functional redundancy of soil bacterial communities including nitrifiers (Wertz *et al.*, 2006, 2007). Investigating the composition of the active nitrifier community using mRNA rather than the genetic community structure could partly explain the decoupling observed between nitrifier activity and community structure.

#### *Phylogenetic affiliation of dominant AOB phylotypes according to grazing regime*

We assessed AOB community structure using two methods—DGGE analysis of amplified 16S rRNA genes and quantification of clones belonging to 16S rRNA-defined phylogenetic groups, following sequencing. Both approaches potentially suffer from biases associated with cell lysis, DNA extraction, choice of primers, PCR amplification and cloning, as many other molecular techniques applicable on a large number of samples, but both are accepted methods for assessment of relative abundance and community composition and the biases were probably the same for all samples here and thus did not prevent comparison of treatment effects. DGGE was used to provide a more general picture of community structure at lower cost, whereas cloning and sequencing were performed to gain greater fine-scale taxonomic resolution.

Sequencing results show that CTO primers adequately amplified fragments of the 16S rRNA gene from *Proteobacteria*  $\beta$ -subgroup AOB, and only 5% of the retrieved sequences were not related to *Nitrosospira* or *Nitrosomonas*. In contrast, up to 80% of the clones retrieved from activated sludge and sediment samples with the CTO primer set fell outside AOB lineages in a previous study (Nicolaisen and Ramsing, 2002).

Nearly all AOB sequences (396 among 397) retrieved from soil of these grassland mesocosms after 18 months were affiliated to *Nitrosospira*. Dominance of the AOB community by *Nitrosospira* has already been reported for soil environments (for example, Kowalchuk *et al.*, 2000; Wheatley *et al.*, 2003). Although the various *Nitrosospira* phylogenetic clusters have been shown to sometimes yield unstable tree topologies (Head *et al.*, 1993; Purkhold *et al.*, 2000), the assignment of the AOB clones to particular clusters in our study was found to be reliable, that is robust when comparing the assignment obtained with the three different treeing algorithms. The only exception was cluster 2 that was differentiated from cluster 3b only with the maximum likelihood method, but only eight sequences were affiliated to this 'cluster 2'. Both cessation and application of grazing strongly modified the relative abundance of AOB phylotypes as related to *Nitrosospira* clusters defined in the literature, whereas the distribution of AOB phylotypes among clusters for treatments corresponding to changes in grazing regime did not resemble that for control treatment corresponding to the new grazing regime. This effect of change in grazing regime and importance of both past and new grazing regimes are consistent with DGGE data for the same samples.

Several authors have reported possible links between the phylogenetic position of AOB and their ecophysiological traits. For instance, based on physiological measurements made on pure culture and enrichment culture representatives of *Nitrosospira*

clusters 3a and 3b, Webster *et al.* (2005) suggested that AOB related to cluster 3a could be sensitive to high ammonia concentration, while AOB related to cluster 3b could be tolerant. Because (i) AOB related to cluster 3a were strongly dominant in G-G soils experiencing urine inputs, (ii) the relative abundance of AOB related to cluster 3b was highest in U-U soils and (iii) the relative abundance in AOB related to cluster 0 increased in both U-G and G-U soils, our results suggest that AOB adapted to both high and low N levels exist within each of these three clusters. Similarly, Kowalchuk *et al.* (2000) observed a predominance of *Nitrosospira* cluster 4 in late successional fields, likely explained by a low ammonia availability in unfertilized grasslands. Consistently, we observed a higher relative abundance of AOB related to cluster 4 in U-U than G-G soils, and an increase in their relative abundance following cessation of grazing/urine input; however, application of grazing did not affect the relative abundance of AOB related to cluster 4 in U-G soils. All these results suggest that functional diversity of AOB as regards to N levels exists within *Nitrosospira* clusters and that taxonomic affiliation does not fully infer functional traits of these organisms.

*Urine input: the key driver of changes in nitrification, AOB/AOA abundance and AOB community structure*  
Because aboveground grazing was mimicked by plant clipping and urine addition on grassland mesocosms, the results do not reflect exactly the response of grassland soil to change in grazing regime under field conditions. Indeed, changes in dung deposition and trampling regime can also influence soil microbiota (Abdelmagid *et al.*, 1987; Ruess and McNaughton, 1987). However, changes in urine input, root functioning and competition between plants and microorganisms are thought to be the key factors mediating linkages between grazing of aboveground plant parts and soil microbiota (Hamilton and Frank, 2001; Bardgett and Wardle, 2003). More generally, more or less severe experimental manipulation of environmental conditions, disturbance regimes and ecological systems is needed to understand better the behavior and driving factors of microbial communities (Kowalchuk and Stephen, 2001). The extent to which aboveground grazing regime was adequately mimicked can be appreciated by the fact that differences in the nitrifier activity between grazed and ungrazed control mesocosms were maintained during the two-year period studied and were consistent with values measured under field conditions (Patra *et al.*, 2005). Furthermore, the fact that nitrifier activity and AOB and AOA abundances were determined mainly by the new management regime after 12 months for both scenarios of change in simulated grazing regime showed that urine input and/or plant clipping were the key drivers of the observed effects of grazing on nitrifiers. In addition,

changes in botanical composition may explain differences in nitrifier activity, abundance and community structure between long-term grazing regime (Patra *et al.*, 2006), but this could not explain the early changes in AOB characteristics in the present study where no major change in plant species composition was observed during the first 6 months in all mesocosms (K Klumpp, personal communication).

## Conclusion

These results are an important step forward to understand the influence of different management techniques on microbial communities involved in nitrification. In particular, they demonstrate that AOB and AOA respond quickly to changes in aboveground grazing regime and that, at least for AOB, the mechanisms involved differ between grazing application and grazing cessation scenarios. Selection of particular AOB populations adapted to the new environmental conditions, in particular persistent high urea supply, was a prerequisite for nitrification enhancement in the U-G treatment. In contrast, the decrease in nitrification observed early for the G-U treatment was likely due to a partial starvation and decrease in the abundance of nitrifying organisms initially present. Nitrifier activity and AOB and AOA abundances became similar to those observed in control mesocosms experiencing the new grazing regime after ca. 12 months. In contrast, both past and new management regimes influenced the AOB community structure and distribution of AOB among phylogenetic groups, which shows the extent of decoupling between community function and composition following change in grassland management regime.

## Acknowledgements

This study was funded by the French Institute of Agronomic Research (INRA, projet innovant Département EA) and was also supported by the Alliance program. We thank V Degrange for comments on the manuscript and L Darmedru for help during cloning–sequencing. We deeply thank Sven Leininger and Christa Schleper from the University of Bergen/Norway for providing the unpublished new primers for AOA quantification.

## References

- Abdelmagid AH, Schuman GE, Hart RH. (1987). Soil bulk-density and water infiltration as affected by grazing systems. *J Range Manage* **40**: 307–309.
- Avrahami S, Liesack W, Conrad R. (2003). Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers. *Environ Microbiol* **5**: 691–705.

- Bardgett RD, Wardle DA. (2003). Herbivore-mediated linkages between aboveground and belowground communities. *Ecology* **84**: 2258–2268.
- Berg P, Rosswall T. (1987). Seasonal variations in abundance and activity of nitrifiers in four arable cropping systems. *Microbial Ecol* **13**: 75–87.
- Busso CA, Briske DD, Olalde-Portugal V. (2001). Root traits associated with nutrient exploitation following defoliation in three coexisting perennial grasses in a semi-arid savanna. *Oikos* **93**: 332–342.
- Doak BW. (1952). Some chemical changes in the nitrogenous constituents of urine when voided on pasture. *J Agric Sci* **42**: 162–171.
- Dollhopf SL, Hyun JH, Smith AC, Adams HJ, O'Brien S, Kostka JE. (2005). Quantification of ammonia-oxidizing bacteria and factors controlling nitrification in salt marsh sediments. *Appl Environ Microbiol* **71**: 240–246.
- Frank DA, Groffman PM. (1998). Ungulate vs landscape control of soil C and N processes in grasslands of Yellowstone National Park. *Ecology* **79**: 2229–2241.
- Frank DA, Groffman PM, Evans RD, Tracy BF. (2000). Ungulate stimulation of nitrogen cycling and retention in Yellowstone Park grasslands. *Oecologia* **123**: 116–121.
- Freitag TE, Prosser JI. (2003). Community structure of ammonia-oxidizing bacteria within anoxic marine sediments. *Appl Env Microbiol* **69**: 1359–1371.
- Galtier N, Gouy M, Gautier C. (1996). SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *CABIOS* **12**: 543–548.
- Griffiths RI, Whiteley AS, O'Donnell AG, Bailey MJ. (2003). Physiological and community responses of established grassland bacterial populations to water stress. *Appl Env Microbiol* **69**: 6961–6968.
- Groffman PM, Rice CW, Tiedje JM. (1993). Denitrification in a tallgrass prairie landscape. *Ecology* **74**: 855–862.
- Guindon S, Gascuel O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**: 696–704.
- Hamilton EW, Frank DA. (2001). Can plants stimulate soil microbes and their own nutrient supply? Evidence from a grazing tolerant grass. *Ecology* **82**: 2397–2402.
- He JZ, Shen JP, Zhang LM, Zhu YG, Zheng YM, Xu MG *et al*. (2007). Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environ Microbiol* **9**: 2364–2374.
- Head IM, Hiorns WD, Embley TM, McCarthy AJ, Saunders JR. (1993). The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal-RNA gene-sequences. *J Gen Microbiol* **139**: 1147–1153.
- Hermansson A, Lindgren PE. (2001). Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* **67**: 972–976.
- Hesselsøe M, Brandt KK, Sorensen J. (2001). Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in soil using microcolony technique combined with fluorescence *in situ* hybridization (MCFU–FISH). *FEMS Microbiol Ecol* **38**: 87–95.
- Könneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* **437**: 543–546.
- Koops HP, Pommerening-Röser A. (2001). Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiol Ecol* **37**: 1–9.
- Kowalchuk GA, Stephen JR. (2001). Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annu Rev Microbiol* **55**: 485–529.
- Kowalchuk GA, Stephen JR, DeBoer W, Prosser JI, Embley TM, Woldendorp JW. (1997). Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl Environ Microbiol* **63**: 1489–1497.
- Kowalchuk GA, Stienstra AW, Hans G, Heilig J, Stephen JR, Woldendorp JW. (2000). Changes in the community structure of ammonia-oxidizing bacteria during secondary succession of calcareous grasslands. *Environ Microbiol* **2**: 99–110.
- Le Roux X, Bardy M, Loiseau P, Louault F. (2003). Stimulation of soil nitrification and denitrification by grazing in grasslands: do changes in plant species composition matter? *Oecologia* **137**: 417–425.
- Leininger S, Urich T, Schloter M, Schwark L, Qi J, Nicol GW *et al*. (2006). Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* **442**: 806–809.
- Lensi R, Mazurie S, Gourbiere F, Josserand A. (1986). Rapid determination of the nitrification potential of an acid forest soil and assessment of its variability. *Soil Biol Biochem* **18**: 239–240.
- Leriche H, Le Roux X, Gignoux J, Tuzet A, Fritz H, Abbadie L *et al*. (2001). Which functional processes control the short-term effect of grazing on net primary production in West African humid grasslands? Assessment by modelling. *Oecologia* **129**: 114–124.
- Luo J, Tillman RW, Ball PR. (1999). Grazing effects on denitrification in a soil under pasture during two contrasting seasons. *Soil Biol Biochem* **31**: 903–912.
- McNaughton SJ, Banyikwa FF, McNaughton MM. (1997). Promotion of the cycling of diet-enhancing nutrients by African grazers. *Science* **278**: 1798–1800.
- McNaughton SJ, Ruess RW, Seagle SW. (1988). Large mammals and process dynamics in African ecosystems. *Bioscience* **38**: 794–800.
- Mendum TA, Sockette RE, Hirsch PR. (1999). Use of molecular and isotopic techniques to monitor the response of autotrophic ammonia oxidising populations of the  $\beta$ -subdivisions of class *Proteobacteria* in arable soils to nitrogenous fertilizers. *Appl Env Microbiol* **65**: 4155–4162.
- Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **59**: 695–700.
- Nicolaisen MH, Ramsing NB. (2002). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *J Microbiol Methods* **50**: 189–203.
- Patra AK, Abbadie L, Clays-Josserand A, Degrange V, Grayston SJ, Guillaumaud N *et al*. (2006). Effects of management regime and plant species on the enzyme activity and genetic structure of N-fixing, denitrifying and nitrifying bacterial communities in grassland soils. *Environ Microbiol* **8**: 1005–1016.
- Patra AK, Abbadie L, Clays-Josserand A, Degrange V, Grayston SJ, Loiseau P *et al*. (2005). Effect of grazing