



HAL
open science

Altération bactérienne des minéraux dans les écosystèmes forestiers pauvres en nutriments: Analyse des communautés bactériennes et identification des mécanismes impliqués

Cendrella Lepleux

► To cite this version:

Cendrella Lepleux. Altération bactérienne des minéraux dans les écosystèmes forestiers pauvres en nutriments: Analyse des communautés bactériennes et identification des mécanismes impliqués. Biologie végétale. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0184 . tel-01749883

HAL Id: tel-01749883

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749883v1>

Submitted on 29 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



E.D. Ressources, Procédés, Produits et Environnement (RP2E)
D.F.D. Biologie Forestière

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université de Lorraine
en Biologie Végétale et Forestière

par **Cendrella LEPLEUX**

ALTERATION BACTERIENNE DES MINERAUX DANS LES ECOSYSTEMES FORESTIERS PAUVRES EN NUTRIMENTS: ANALYSE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET IDENTIFICATION DES MECANISMES IMPLIQUES

Soutenance publique le 3 Décembre 2012

Membres du Jury:

Pr. Pierre Leblond <i>Professeur à l'Université de Lorraine de Nancy</i>	Président du jury
Dr. Christophe Mougel <i>Directeur de recherche au centre INRA de Dijon</i>	Rapporteur
Dr. Alain Sarniguet <i>Directeur de recherche au centre INRA de Rennes</i>	Rapporteur
Dr. Pascal Simonet <i>Directeur de recherche au CNRS de Lyon</i>	Examineur
Pr. Stéphane Vuilleumier <i>Professeur à l'Université de Strasbourg</i>	Examineur
Dr. Marie-Pierre Turpault <i>Directeur de recherche au centre INRA de Nancy</i>	Examineur
Dr. Pascale Frey-Klett <i>Directeur de recherche au centre INRA de Nancy, Directrice de thèse</i>	Examineur
Dr. Stéphane Uroz <i>Chargé de recherche au centre INRA de Nancy, Co-directeur de thèse</i>	Examineur
Dr. Laura C. Kelly <i>Chercheur Post-doctoral au centre INRA de Nancy</i>	Chercheur invité

A mon grand-père

Travaillez, prenez de la peine ;
C'est le fond qui manque le moins.

Un riche laboureur, sentant sa mort prochaine,
Fit venir ses enfants, leur parla sans témoins.
Gardez-vous, leur dit-il, de vendre l'héritage
Que nous ont laissé nos parents :
Un trésor est caché dedans.
Je ne sais pas l'endroit ; mais un peu de courage
Vous le fera trouver : vous en viendrez à bout.
Remuez votre champ dès qu'on aura fait l'oût :
Creusez, fouillez, bêchez ; ne laissez nulle place
Où la main ne passe et repasse.
Le père mort, les fils vous retournent le champ,
Deçà, delà, partout ; si bien qu'au bout de l'an
Il en rapporta d'avantage.
D'argent, point de caché. Mais le père fut sage
De leur montrer, avant sa mort,
Que le travail est un trésor.

Le Laboureur et ses enfants, Livre Cinquième,
Fables,
La Fontaine.



Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier l'INRA et la Région Lorraine dont le soutien financier m'a permis de faire ma thèse.

Merci à Christophe Mougel, Alain Sarniguet, Pierre Leblond, Pascal Simonet, Stéphane Vuilleumier et Laura Kelly d'avoir accepté de faire parti de mon jury de thèse.

A mes trois encadrants, de m'avoir donné la chance de réaliser cette thèse. Pascale, merci pour tes conseils, ton soutien, ta bonne humeur et ton côté humain. Marie-Pierre, je n'avais absolument aucune connaissance dans l'art subtil de la minéralogie et de la géologie et je te remercie de la patience dont tu as fait preuve pour m'apprendre les quelques bases que j'ai pu acquérir pendant cette thèse. Ce n'est pas de sitôt que j'oublierai la différence entre un micas et un feldspath ! Je te remercie également pour ta disponibilité, ta bonne humeur et surtout ton côté optimiste et tes encouragements !! Stéphane, que dire ... ? Merci de m'avoir transmis une partie de ton savoir et ta rigueur scientifique. Merci pour ta disponibilité même lorsque je débarquais dans ton bureau (« Dis chef, j'ai une question ... ? ») et pour tes commentaires toujours constructifs sur mon travail et qui m'ont beaucoup aidé notamment pour la rédaction du mémoire. Je finirai donc sur un « Merci Chef ! ».

Un merci tout particulier à Nicole avec qui l'administration, les notes de frais et les ordres de mission deviennent faciles !

Aude merci pour tes conseils et tous tes encouragements et aussi de m'avoir fait découvrir cet endroit merveilleux qu'est la villa pompeï !

Béacriiiiiche, merci pour ta bonne humeur, tes blagues que tu n'arrives jamais à finir, tes conseils et ton franc-parler reconnu de tous !

Sanjay, thank you very very much for all your help ! And now I never see a chicken bucket in the same way ^^

Aurore et Emeline merci pour votre soutien (entre doctorantes ^^) et nos discussions existentielles sur le « pourquoi du comment » ...

Manu, merci pour tous les matchs de boxe auxquels j'ai pu assister et surtout merci de ne pas m'avoir mis un punch accidentel ... ^^

Alice, ah là là là là merci pour toutes tes remarques pas toujours intelligentes mais qui font tellement rire et aussi pour toutes tes fautes d'orthographe et de grammaire orales et écrites ... Juste une chose, le jour où tu décides de faire la dictée de B. Pivot préviens moi, j'achèterai des pop-corns...

Mr Hervé, p'tit chamallow, merci pour ta bonne humeur, tes vannes et ta répartie plus ou moins douteuse(s), tes conseils pas toujours bons à suivre et pour tous ces bons moments passés dans le bureau ! Je te souhaite de pouvoir un jour réaliser tout tes rêves et devenir « Le roi du pétrole » !! Enfin, j'espère que le « Copenhaguen pen » t'apporteras (ou t'as apporté !?) entière satisfaction ...

Merci aussi à tous les autres membres du labo : Emilie, Benjamin, Annegret, Chouchou !!!!, Cyrille, Christine, Nicole, Agnès, Seb, Laura, Marie-Claude, Sapna, Thibaut, Pépère, Juliette, François, Francis, Pas triste, Jean, Aurélie, Marc, Claude, Valérie, Claire, Christine et Yann.

Merci aussi à ceux qui sont passés par le IAM mais qui ont su m'apporter un petit quelque chose de scientifique ou non : Christophe, Christelle, Mauricio, Pete, Steph H. Sara, Sarah, Elodie, Mathilde, Junior, Adeeeeeeline et bien sûr Mimi Cracra qui se reconnaîtra !

Je souhaite également remercier Cécile pour toutes nos soirées filles, nos délires et d'avoir toujours été là quand j'en avais besoin ! Je suis vraiment contente de t'avoir rencontrée !!!

Un grand merci à Virginie et Coralie. Malgré le fait que l'on ne se contacte pas souvent je vous remercie toutes les deux d'avoir su me guider et de m'avoir donné confiance en moi !!!

Merci à Mme Ferry pour tout son soutien, ses conseils, ses encouragements et beaucoup d'autres choses...

Merci à tous ceux du 77 qui m'ont aidée à garder un semblant de vie sociale pendant cette thèse et ce, même si je n'étais pas toujours très disponible : Caro & Anthony, les Jumeaux, Choupinet, ma petite Florette (et son Arthur ^^), mon Xaviooooooooo et bien sûr ma cht'ite Fulgees !!

Merci à ma p'tite Cha ... Tu as toujours été prête à lire mes très looooongs mails quand ça n'allait pas fort et tu as toujours su me redonner courage et sourire !! Merci pour ces conversations par mails interposés sur nos problèmes de thèse ... Merci aussi d'être venue quelques fois me rendre visite en Lorraine où il n'y a rien à faire ... ! Allez l'année prochaine c'est ton tour !!! Bon courage !!

*KMYYYYYY !!!!! Hii !! ^^
Merci, Merci, Merci pour tout !! D'avoir toujours été là quand j'en avais besoin, pour tous les fous rires et les délires que j'ai pu avoir avec toi ! Heureusement que tu venais de temps en temps pour me rappeler la vie de Ch'Nord !! Bref merci juste d'être toi ! JTD ! Hii !!*

Merci à la famille Cichocki-Delfosse et tout particulièrement à Martine et Henri, pour tous ces week-end eud'éteiiiiinnnte d'in Ch'Nord qui m'ont permis de déconnecter de la thèse et pour leur soutien.

*A ma mère qui m'a toujours dit de bien travailler à l'école...
Merci à mon ch'ti frère pour sa joie de vivre et sa capacité à faire le clown à tout moment !
Merci à mes grands-parents pour tout leur soutien et sans qui je n'aurai jamais pu faire d'études.
Merci à mon père pour tout le soutien qu'il m'a apporté au cours de ces trois années, pour avoir toujours cru en mes capacités et pour tous ses conseils ... Merci papa !*

Enfin, merci à toi Nicolas qui a quitté ton bien-aimé Ch'Nord pour me suivre en Lorraine ... merci de n'avoir jamais douté de moi, même lorsque je n'y croyais plus, merci de ton soutien, de ton amour, de tes encouragements ... Bref, merci tout simplement d'être là...

SOMMAIRE

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
1. CONTEXTE	2
2. L'ALTERATION MINERALE	3
2.1. <i>Mécanismes abiotiques de l'altération</i>	6
2.1.1 Les mécanismes physiques	6
2.1.2 Les mécanismes chimiques	7
2.2. <i>Acteurs biologiques de l'altération des minéraux</i>	9
2.2.1 Les effets indirects	9
2.2.2 Altération physique	9
2.2.3 Altération chimique	10
2.3. <i>L'altération bactérienne en forêt</i>	15
2.3.1 Effet sélectif de la rhizosphère et de la mycorrhizosphère sur les communautés bactériennes du sol	15
2.3.2 Influence de l'essence d'arbre sur la capacité d'altération des communautés bactériennes du sol	16
2.3.3 Influence de la saison sur la capacité d'altération des communautés bactériennes du sol	17
2.3.4 L'influence potentielle de la disponibilité en nutriments	17
3. ARTICLE: BACTERIAL WEATHERING AND ITS CONTRIBUTION TO NUTRIENT CYCLING IN TEMPERATE FOREST ECOSYSTEMS	19
4. LES MINERAUX : UNE NICHE ECOLOGIQUE POTENTIELLE POUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES	32
4.1. <i>Définition</i>	32
4.2. <i>Les minéraux comme habitat pour les communautés bactériennes</i>	32
4.3. <i>Les facteurs influençant la colonisation des minéraux.</i>	34
4.3.1 Les facteurs environnementaux	34
4.3.2 Les caractéristiques physiques et cristalochimiques des minéraux	36
4.4. <i>Les communautés bactériennes associées la surface des minéraux et leur capacité à altérer les minéraux</i>	38
4.4.1 Données taxonomiques et fonctionnelles	38
5. OBJECTIFS DE LA THESE	40
CHAPITRE 2 : CARACTÉRISATION TAXONOMIQUE ET FONCTIONNELLE DES COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES ASSOCIÉES À LA SURFACE DES MINÉRAUX DU SOL D'UN ÉCOSYSTÈME FORESTIER PAUVRE EN NUTRIMENTS	41
1. INTRODUCTION	42
2. OBJECTIFS	43
3. METHODES EMPLOYEES	43
4. SYNTHÈSE DES RESULTATS	44
5. ARTICLE: ABUNDANCE OF BETAPROTEOBACTERIA ON MINERAL SURFACES CORRELATES WITH MINERAL WEATHERING IN FOREST SOILS.	46
6. DISCUSSION GENERALE	70
CONCLUSION	73
CHAPITRE 3 : IMPACT DE LA BIODISPONIBILITÉ DES NUTRIMENTS INORGANIQUES SUR LA STRUCTURE TAXONOMIQUE ET FONCTIONNELLE DES BACTÉRIES DU SOL ET DE LA RHIZOSPHÈRE : MANIPULATION D'UNE PLANTATION PAR AMENDEMENT CALCO-MAGNÉSIE	74
1. INTRODUCTION	75
2. OBJECTIFS	77
3. METHODES EMPLOYEES	77
4. SYNTHÈSE DES RESULTATS	79

5. ARTICLE : A SHORT-TERM MINERAL AMENDMENT IMPACTS THE MINERAL WEATHERING BACTERIAL COMMUNITIES IN AN ACIDIC FOREST SOIL.	81
6. RESULTATS SUPPLEMENTAIRES	98
6.1. Résultats	98
6.2. Interprétation	98
7. CONCLUSION	99
CHAPITRE 4 : CONCLUSIONS – PERSPECTIVES	101
<hr/>	
1. SYNTHÈSE DES RESULTATS	102
2. LES BACTÉRIES APPARTENANT AUX GENRES <i>BURKHOLDERIA</i> ET <i>COLLIMONAS</i> : DES BIOMARQUEURS DE L'ALTÉRATION	102
3. EFFET DE L'ESSENCE FORESTIÈRE SUR L'ALTÉRATION DES MINÉRAUX	105
4. IMPACT DE LA DISPONIBILITÉ EN NUTRIMENTS INORGANIQUES	106
5. LES MINÉRAUX : UNE ZONE D'ÉCHANGE ET UN HABITAT POUR LES MICROORGANISMES	107
6. RÉFLEXION SUR L'AMENDMENT DES MODÈLES PRÉDICTIFS DES FLUX DE NUTRIMENTS :	108
7. SOLS FORESTIERS : RÉSERVOIR DE DIVERSITÉ	110
8. PERSPECTIVES	111
8.1. A court et moyen terme	111
8.2. A long terme	112
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	113
<hr/>	
ANNEXES	135
<hr/>	

TABLE DES FIGURES

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Figure 1.1 :	Schéma du cycle géochimique d'un écosystème forestier	Face p 2
Figure 1.2 :	Définition du taux de saturation d'un sol	Face p 12
Figure 1.3 :	Colonisation de surfaces minérales soumises aux conditions environnementales	Face p 35
Figure 1.4 :	Lichens colonisant les murs de l'Eglise de Doue (XIIIe s.) en Seine-et-Marne (France)	Face p 35
Figure 1.5 :	Altération de surfaces minérales visibles à l'œil nu	Face p 36

CHAPITRE 2 : CARACTERISATION TAXONOMIQUE ET FONCTIONNELLE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES ASSOCIEES A LA SURFACE DES MINERAUX D'UN SOL D'UN ECOSYSTEME FORESTIER PAUVRE EN NUTRIMENTS

Box 1 :	Le pyroséquençage 454	Face p 44
	<u>Figure A</u> : Principe de la technique de pyroséquençage	
	<u>Figure B</u> : Principe de la technologie 454	
Box 2 :	Profil métabolique des souches de la minéralosphère	Face p 72
	<u>Figure C</u> : Comparaison des profils métaboliques des communautés bactériennes isolées de la minéralosphère ou de la mycorhizosphère	
	<u>Figure D</u> : Comparaison détaillée du profil métabolique des souches isolées de la minéralosphère et de la mycorhizosphère	

CHAPITRE 3 : IMPACT DE LA DISPONIBILITE DES NUTRIMENTS INORGANQUES SUR LA STRUCTURE TAXONOMIQUE ET FONCTIONNELLE DES BACTERIES DU SOL ET DE LA RHIZOSPHERE : MANIPULATION D'UN PLANTATION PAR AMENDEMENT CALCO-MAGNESIEN

Figure 3.1 :	Utilisation des carottes de sol	Face p 78
Figure 3.2 :	Activités enzymatiques	Face p 99

CHAPITRE 5 : CONCLUSION – PERSPECTIVES

Figure 5.1 :	Impact de la disponibilité en nutriments sur la structuration fonctionnelle des communautés bactériennes du sol	Face p 106
Figure 5.2 :	Corrélation entre le taux global de dissolution de minéraux et abondance de β -proteobacteria à leur surface	Face p 107
Figure 5.3 :	Schéma récapitulatif des niches connues pour leur implication dans l'altération minérale en forêt	Face p 108

INDEX DES TABLES

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Tableau 1.1 :	Liste non exhaustive des études ayant caractérisé des bactéries à la surface des minéraux	Face p 33 et 34
---------------	---	-----------------

CHAPITRE 1 :
INTRODUCTION

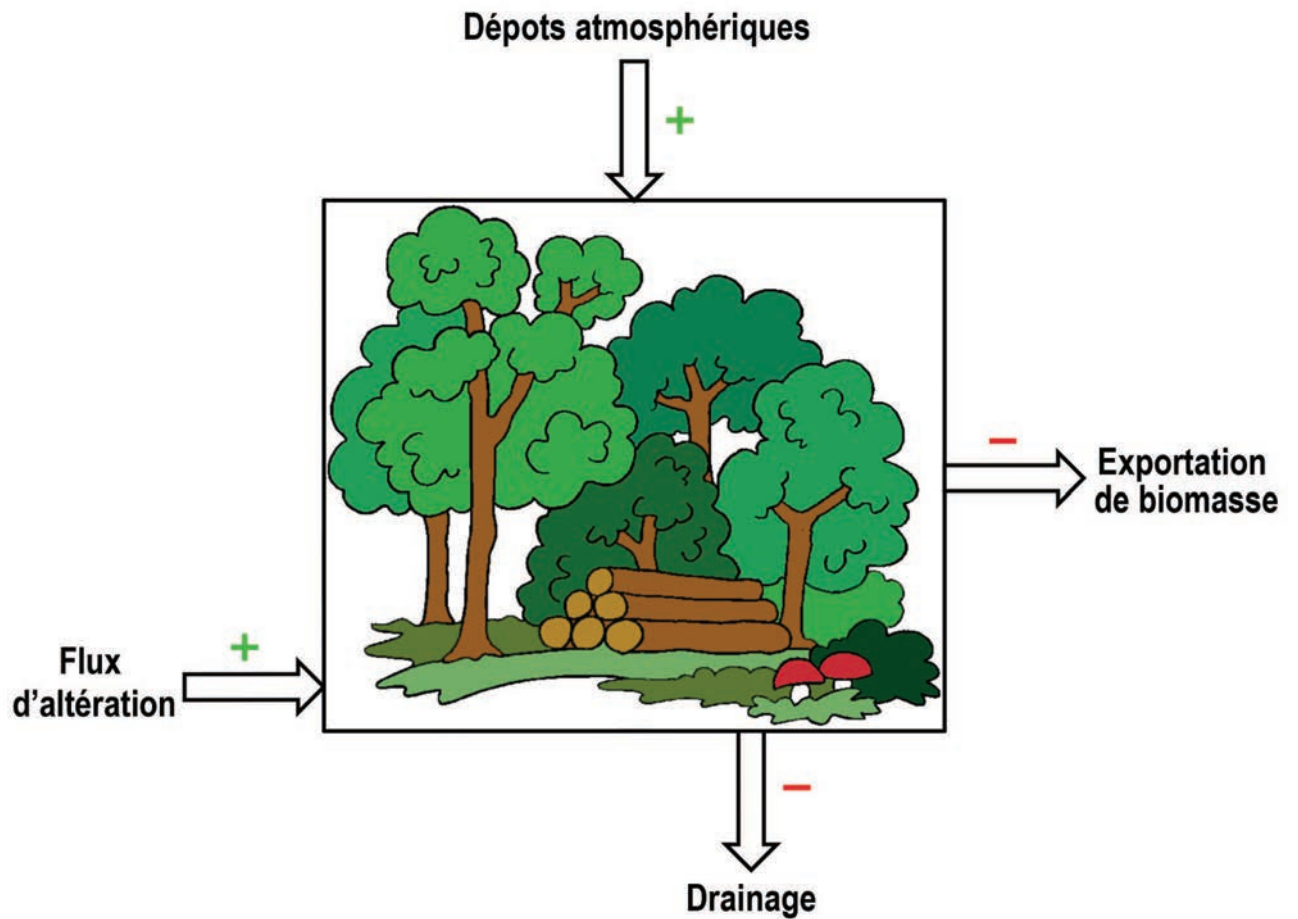


Figure 1.1 : Schéma du cycle géochimique d'un écosystème forestier.

Les flux d'entrée sont représentés par un + vert (dépôts atmosphériques et flux d'altération) et les flux de sortie par un - rouge (drainage et exportation de biomasse).

1. Contexte

Au delà de la définition de l'écosystème donnée par Paul Duvigneaud (1974) qui stipule qu'un écosystème se définit par l'ensemble des interactions qui lient les êtres vivants entre eux et à leur environnement abiotique (climat, sol), **les écosystèmes forestiers se caractérisent par le développement de plantes pérennes, les arbres, qui peuvent impacter jusqu'à plusieurs siècles le réservoir nutritif de leur environnement durant leur vie** (chêne, 300-400 ans ; épicéa 400 à 500 ans). Cette précision peut paraître triviale, mais singularise les écosystèmes forestiers des écosystèmes agricoles qui sont soumis à des rotations de cultures pluriannuelles. Cette différence d'usage des sols a pour conséquence de renforcer l'importance des cycles biogéochimiques sur le développement et le maintien des forêts. **Autrement dit, la production de biomasse de ces écosystèmes sur le long terme dépend du bon équilibre des cycles biogéochimiques et notamment de la biodisponibilité des éléments nutritifs nécessaires à la croissance des arbres.** Les cycles biogéochimiques représentent la circulation permanente des éléments minéraux tels que l'azote, le phosphore ou encore le magnésium, entre les arbres et le sol. Lorsque ces cycles sont à l'équilibre, ils devraient théoriquement assurer le maintien de la qualité du sol, c'est-à-dire la biodisponibilité des nutriments, par le recyclage permanent des éléments nutritifs. Or, les forêts étant des systèmes ouverts, quatre flux peuvent venir perturber cet équilibre : les dépôts atmosphériques et l'altération des minéraux du sol (flux d'entrée), le drainage et l'exportation de la biomasse (flux de sortie) (Bormann et Likens, 1979 ; Ranger et Turpault, 1999) (Figure 1.1) :

- Les **dépôts atmosphériques** représentent une part importante des éléments apportés à l'écosystème. Ils peuvent être contenus dans la pluie, le brouillard ou encore dans des aérosols et des particules minérales se déposant sur la canopée (Lequy *et al.*, 2012). A titre d'exemple, l'apport de calcium par les dépôts atmosphériques est estimé en France entre 4 et 16 kg par hectare et par an, selon le site considéré (Ranger *et al.*, 2002).
- **L'altération des minéraux** du sol libère des nutriments inorganiques. Sans ce processus, les nutriments contenus dans la structure cristalline des minéraux ne sont pas directement accessibles aux organismes du sol ou aux arbres. La quantité de minéraux contenant des éléments nutritifs dépend des caractéristiques de la roche mère et de l'évolution du sol et constitue **une ressource limitée et non renouvelable** (Fichter *et al.*, 1998). A titre d'exemple, les sols acides, comme ceux des forêts des régions tempérées, se caractérisent par des minéraux peu altérables tels que les micas blancs ou les feldspaths potassiques (Ranger et Turpault, 1999).

- Le **flux d'eau** draine en profondeur une partie de ces éléments nutritifs ce qui constitue une **perte de nutriments pour l'écosystème**.
- La plupart des forêts sont **exploitées pour la ressource bois**. Le prélèvement de biomasse par les gestionnaires constitue une **perte pour les écosystèmes car les nutriments contenus dans les arbres prélevés ne sont alors plus recyclés** (Le Goaster *et al.*, 1991 ; Glatzel, 1991). Ce flux de sortie est le seul sur lequel on peut agir facilement pour assurer une gestion durable de ces écosystèmes forestiers en laissant les rémanents d'exploitation au sol ou *via* le choix de l'essence forestière.

En dehors de la présence des arbres, d'un fort recyclage des matières organiques, des flux d'entrées et de sorties qui caractérisent les écosystèmes forestiers, c'est la localisation dans nos régions tempérées des forêts, sur des sols particuliers qui les singularisent un peu plus des sols agricoles. En effet, la plupart des forêts françaises et au delà, des régions tempérées, sont actuellement situées sur des sols acides pauvres en nutriments disponibles. Cette localisation tient en grande partie à l'action de l'Homme, qui a privilégié l'usage des sols les plus riches et adaptés pour l'agriculture, limitant son action sur les autres sols. Des rotations forêt/milieu agricole ont néanmoins eu lieu au cours des siècles passés, comme en témoignent des vestiges d'exploitations agricoles qui ont été retrouvés par exemple dans les forêts du nord de la France (Dupouey *et al.*, 2002 ; Jussy *et al.*, 2002). Enfin une autre particularité importante des écosystèmes forestiers, c'est leur mode gestion. En effet, bien que développées sur des sols acides, les forêts sont rarement amendées. En conséquence, l'exploitation par l'Homme de la ressource bois et son intensification, combinée avec un retrait des rémanents au sol pourrait conduire à des déséquilibres des cycles biogéochimiques et de la fertilité des sols. Dans ce contexte, **les minéraux du sol constituent une des principales sources de cations nutritifs nécessaires au bon développement des écosystèmes forestiers et, en conséquence, l'altération des minéraux est un processus majeur**.

2. L'altération minérale

L'altération minérale se définit comme un ensemble de processus conduisant à la dissolution ou à la transformation d'un minéral par des réactions abiotiques ou biotiques. Cette altération minérale est un facteur clef, conditionnant notamment la formation et la stabilité des roches et des sédiments, et impacte également la fertilité du sol ainsi que la qualité de l'eau (rivières, lacs et océans) (Banfield *et al.*, 1999). L'altération minérale se réfère à quatre processus : un processus physique, la microdivision, et trois processus chimiques, la dissolution, la transformation et la néoformation. La **microdivision** se

traduit par le fractionnement de la roche, en fragments de plus en plus petits. Cette réaction joue un rôle indirect dans l'altération de la roche puisqu'elle contribue à augmenter la surface de minéral en contact d'une part avec les solutions du sol et d'autre part, avec les acteurs biologiques du sol (ex : racines des arbres). Les trois autres réactions sont directement impliquées dans l'altération. La **dissolution** correspond à la solubilisation de l'ensemble des éléments constituant la structure cristalline d'un minéral et contribue au flux d'altération. La **néoformation** est une réaction qui ne contribue pas au flux d'altération puisqu'il s'agit d'une précipitation des ions en solution. Quand la solution est saturée vis-à-vis d'une phase minérale, les ions peuvent précipiter pour former des minéraux secondaires solides (cristallisés ou amorphes). Par exemple, lorsqu'une solution est saturée en Na et en Cl, il y a précipitation et formation de cristaux de sel (NaCl). Enfin la **transformation** est une réaction intermédiaire entre la dissolution et la néoformation puisqu'elle libère certains éléments chimiques et en consomme d'autres. Par exemple, la transformation de micas (phyllosilicates) en vermiculite libère du potassium. **Le flux d'altération minérale est ainsi défini par le bilan des ions qui sont passés en solution lors de ces différentes réactions.** Dans la suite de cette thèse, le terme « altération minérale » se référera au processus de dissolution des minéraux.

Le processus de dissolution résulte du contact entre un minéral et une phase aqueuse souvent chargée en agents plus ou moins altérants, ce qui provoque la destruction des réseaux cristallins. Le taux de dissolution d'un minéral en système saturé en eau est influencé par des facteurs externes [(i), (ii), (iii)] et intrinsèques au minéral [(iv), (v), (vi)] :

- (i) **la composition de la solution en agents altérants** : les agents altérants (protons, acides organique et inorganiques, molécules chélatrices, CO₂, etc.) présents dans la solution interagissent avec la surface du minéral et participent à la dissolution des minéraux (White, 1995 ; Welch *et al.*, 1999 ; Wilson, 2004). En particulier, le pH de la solution influence la dissolution des minéraux. Les minéraux sont plus instables lorsqu'ils sont soumis à des conditions de pH acide ou basique (activité (α) des ions altérants H⁺ ou OH⁻). A titre d'exemple, la vitesse de dissolution des minéraux augmente lorsque le pH du milieu diminue (White, 1995 ; Brantley et Chen, 1995 ; Brantley, 2003).
- (ii) **le potentiel redox de la solution** : les réactions d'oxydation des minéraux contenant du fer et du manganèse sont importantes car elles modifient localement l'équilibre des charges (minéral/solution), conduisant à la destruction de la structure cristalline des minéraux et à la libération de cations nutritifs (Welch et Ullman, 1996 ; Harley et Gilkes, 2000).
- (iii) **la température** : d'un point de vue purement chimique, la température influence l'énergie d'activation de la réaction minéral/solution, plus la température est élevée, plus la réaction

est forte, ce qui a pour conséquence d'accélérer la vitesse de dissolution des minéraux (Welch *et al.*, 1999 ; Wilson, 2004 ; Brantley, 2008).

- (iv) **la surface du minéral** : plus la surface du minéral en contact avec la solution est grande, plus le minéral sera sujet au processus de dissolution (Brantley, 2003). A titre d'exemple, la désagrégation physique des minéraux (microdivision), en augmentant les surfaces minérales accessibles, va favoriser la dissolution de ces minéraux.
- (v) **la constante de stabilité du minéral** : certains minéraux s'altèrent plus ou moins rapidement. Le quartz, par exemple s'altère très lentement. Cette constante traduit ce fait. Elle est propre à chaque minéral et dépend de sa composition chimique et de sa cristallographie (Banfield & Hamers, 1997 ; Brantley, 2008).
- (vi) **l'indice de saturation de la solution** : La composition chimique de la solution (et surtout la concentration en éléments chimiques aussi contenu dans le minéral) a un impact sur la vitesse de dissolution, plus la solution sera chargée en éléments contenus dans le minéral, moins sa dissolution ira vite. Lorsque la solution devient très concentrée, la réaction s'inverse et le minéral précipite. Les mécanismes de dissolution et de précipitation du minéral dépendent des différents degrés de saturation de ces fluides vis-à-vis des minéraux (White, 1995 ; Banfield & Hamers, 1997).

La vitesse de dissolution théorique (V_m en moles/an) d'un minéral m peut-être exprimée de la façon suivante (Madé, 1991):

$$V_m = K_m \times S_m \times \alpha_j^n \times \left(1 - \frac{Q_m}{K_m}\right)$$

Avec :

K_m : Constante de dissolution intrinsèque du minéral m (moles/m²/an)

S_m : Surface de contact effective entre le minéral m et un kilogramme de solution (m²/kg)

α_j^n : Activité de l'espèce aqueuse j (H⁺, OH⁻, ...), n étant un exposant permettant de tenir compte de la dépendance de la vitesse de dissolution du minéral m par rapport à l'espèce aqueuse j

$1 - \frac{Q_m}{K_m}$: Indice de saturation du minéral en solution (Q_m : produit ionique d'activité du minéral m ;

K_m : Constante d'équilibre thermodynamique du minérale m à la température et la pression fixées).

De plus, il est important de souligner que, dans les sols, qui sont, en général, des milieux non saturés en eau, la quantité d'eau (humidité) au contact des minéraux est un facteur important. La

vitesse de renouvellement de l'eau du sol influence directement l'indice de saturation et est notamment dépendante de la pluviométrie, de la texture et de la structure du sol.

Tous ces facteurs sont eux-mêmes influencés par des processus biotiques et abiotiques faisant intervenir différents mécanismes physiques et/ou chimiques. La difficulté est d'accumuler suffisamment de données sur ces différents aspects, pour être capable d'améliorer cette équation théorique et d'être capable d'y intégrer l'action des acteurs biologiques (arbre, champignon, bactéries ...) (Calvaruso *et al.*, soumis).

2.1. Mécanismes abiotiques de l'altération

Parmi les **mécanismes physiques** contribuant à l'altération des minéraux, les principaux sont la **température ou les pressions exercées par l'action de l'eau ou de l'air**. De la même manière, les principaux **mécanismes chimiques** impliquent d'une part différentes réactions d'acidification/chélation en phase aqueuse et d'autre part la propriété des solutions à maintenir un équilibre chimique stable (Loi de Le Châtelier). L'altération « chimique » des roches est donc en partie fonction de **l'état d'équilibre des solutions** avec lesquelles les surfaces minérales sont en contact. **Ces phénomènes physiques et chimiques agissent de concert dans le processus de l'altération.**

2.1.1 Les mécanismes physiques

Le facteur physique le plus connu pour son action d'érosion des roches est l'air et, plus précisément le vent (Gillies *et al.*, 2009), mais ne s'applique que pour les roches de surface. Au-delà du vent, des bulles d'air peuvent également être emprisonnées lors du passage d'un fort courant d'eau ou tout simplement lors d'une glaciation de la roche (comme dans les glaciers par exemple). Cet air emprisonné est alors soumis à une compression au niveau des pores de la roche et l'affaiblit contribuant ainsi à l'augmentation des fissures.

Parmi les facteurs abiotiques de l'altération minérale se trouve également la température. Plusieurs chercheurs ont démontré que, lorsqu'une roche est soumise à des variations importantes de température (thermoclastie) elle se fracture et ce, à plusieurs échelles (Bahr *et al.*, 1986 ; Hall *et al.*, 1997, 1998, 1999, 2001 ; McKay *et al.*, 2009). Par exemple, en 2008, Hall *et al.*, ont fait une étude sur l'altération d'une roche granitique située au niveau d'un affleurement en Antarctique et ont démontré que les variations de température conduisaient à une altération à l'échelle des cristaux des minéraux.

Lorsque le soleil éclaire l’affleurement de granite, les minéraux tels que les feldspaths, de couleur claire, et les micas noirs, n’emmagasinent pas la chaleur de la même façon à cause du phénomène d’albédo. Ainsi les feldspaths chauffent moins vite et refroidissent beaucoup plus vite du fait de leur couleur claire, tandis que les micas emmagasinent plus de chaleur et ce, pour plus longtemps. Ces différences de fluctuations de température conduisent à la fracturation de la roche à l’échelle des cristaux (Hall *et al.*, 2008).

L’eau est également un facteur abiotique important dans l’altération tant au niveau de la désagrégation physique des roches qu’au niveau chimique, que nous verrons plus tard. Les roches et les minéraux du sol ou de surface, présentent généralement beaucoup de pores et des fissures dans lesquels l’eau peut s’infiltrer. Les cycles de gel et dégel de l’eau vont alors causer la désagrégation de la roche (i.e. cryoclastie) (Hallet, 2006 ; Matsuoka, 2008). En effet, lorsqu’une période de gel arrive cette eau gèle et gagne en volume fracturant ainsi la roche. Par la suite l’eau dégèle et s’infiltrer un peu plus profondément dans la roche ce qui mènera à la continuation de la désagrégation de la roche à la prochaine période de gel. En haute montagne, ce phénomène conduit le plus souvent à l’explosion de la roche (Matsuoka, 2008). La circulation de l’eau peut également causer l’altération des roches comme dans le lit des rivières par exemple (Zhaoyu *et al.*, 2004 ; Bryan, 2000 ; Lévy *et al.*, 2012). L’action des vagues sur les côtes est également un phénomène d’altération (Hall *et al.*, 2008). D’autre part, le sel est également considéré comme un facteur physique de l’altération essentiellement dans les milieux où il y a des périodes de sécheresse. En effet, l’eau contenant du sel dissout s’infiltrer dans les pores et les fissures des roches en période humide. Cependant, il arrive un moment, en particulier en période sèche, où l’eau contenue dans les pores est sursaturée en sel conduisant à la recristallisation de ce dernier ce qui cause de nouvelles fissures dans la roche due à la pression exercée par l’augmentation du volume « eau + sel » (Kuchitsu *et al.*, 2000 ; Jagoutz, 2006 ; Angeli *et al.*, 2010 ; Liu *et al.*, 2011a).

Dans le cas des minéraux des sols des écosystèmes forestiers, en climat tempéré et hors des reliefs importants, ce sont surtout la circulation de l’eau et la cryoclastie qui conduisent à leur désagrégation physique.

2.1.2 Les mécanismes chimiques

Les principaux agents altérants abiotiques arrivent *via* les précipitations. Il s’agit de l’eau elle-même ou des acides contenus dans celle-ci. En fonction du type d’agent altérant, ces réactions sont qualifiées

d'hydrolyse (eau), d'acidolyse (acide fort), de complexolyse (agent complexant) ou d'oxydo-réduction (échange d'électron) (Duchaufour, 1983).

La formation d'acide carbonique est une des principales réactions chimiques conduisant à l'altération abiotique des minéraux, et essentiellement ceux contenant du calcaire. Le dioxyde de carbone contenu dans l'air peut se dissoudre dans la pluie formant ainsi de l'acide carbonique qui en réagissant par exemple, avec des roches calcaires, conduit à la formation de carbonate de calcium soluble en solution. A l'échelle du globe, les réactions actuelles d'altération des minéraux consomment du carbone atmosphérique à hauteur de 0,3 Gt/an (Gaillardet *et al.*, 1999).

D'autres acides peuvent se former naturellement et notamment ceux contenus dans les **pluies acides**. La pollution, les émissions volcaniques ou encore la foudre émettent des oxydes de soufre (SO₂ et SO₃) ou d'azote (NO et NO₂) qui, en réagissant avec l'eau de pluie, forment respectivement de l'acide sulfureux et nitrique (Barker *et al.*, 1997). Ces deux acides sont considérés comme des **acides forts et peuvent conduire à la dissolution des minéraux du sol**.

Une autre réaction chimique impliquée dans l'altération abiotique des minéraux est l'**hydrolyse**. Les ions présents à la surface des minéraux peuvent réagir avec de l'hydrogène « ionisé » contenu dans l'eau (ion oxonium H₃O⁺) ce qui conduit le plus souvent à **la dissolution totale du minéral** s'il y a assez d'eau. En d'autres termes, l'hydrolyse est fonction de la concentration en ions oxonium de la solution et par conséquent, **plus le pH sera acide, plus il y aura de réaction d'hydrolyse**.

Un autre processus connu d'altération chimique est l'**oxydation** qui se traduit généralement par la formation d'un **précipité (minéraux secondaire) à la surface du minéral, ce qui le fragilise**. Cette réaction est la combinaison d'ions tels que le Fe²⁺, par exemple, avec l'oxygène contenu dans l'eau et qui conduit à la formation d'hydroxydes comme de l'hydroxyde de fer [Fe(OH)₃], par exemple.

S'il est clair que ces différents processus abiotiques contribuent fortement à l'altération des minéraux, **les différents organismes et microorganismes colonisant l'environnement tels que les racines des arbres, les champignons, les lichens, les bactéries, les vers de terre ou encore les insectes jouent aussi un rôle important** (Robert et Berthelin, 1986).

2.2. Acteurs biologiques de l'altération des minéraux

2.2.1 Les effets indirects

La diversité des populations microbiennes du sol ainsi que leur diverses capacités métaboliques leur fait jouer un rôle capital dans les transferts d'énergie et notamment dans le fonctionnement des cycles du carbone, de l'azote et du soufre (Berthelin *et al.*, 1983). **Leur rôle dans la décomposition et la minéralisation de la matière organique modifie les solutions du sol en transformant la matière organique en énergie.** La formation de composés tels que le CO₂, H₂O, NH₃ ou encore SO₄²⁻ lors de la dégradation de la matière organique perturbe la composition des solutions du sol contribuant ainsi à l'altération indirecte des minéraux par les microorganismes du sol (Berthelin *et al.*, 1983).

Un autre effet indirect sur l'altération par les microorganismes du sol ainsi que par la macrofaune et les racines des arbres est **leur rôle dans la stabilité et la formation des agrégats du sol.** Cette agrégation se produit par l'effet d'adhésion des exopolysaccharides produits par les racines, les champignons et, dans une moindre mesure, par les bactéries qui, quant à elles, participeraient à la formation des agrégats à l'échelle du micron (Berthelin *et al.*, 1983 ; Tisdall, 1994; Deneff *et al.*, 2002). L'enchevêtrement des particules de sol par les champignons filamenteux et par les racines participerait également à la formation d'agrégats et à la stabilité du sol (Barker *et al.*, 1997). **La taille et la stabilité des agrégats contrôle la diffusion des nutriments ainsi que la circulation de l'eau, ce qui agit sur la surface de contact solution/minéral influençant ainsi la dissolution des minéraux** (Berthelin *et al.*, 1983 ; Barker *et al.*, 1997).

2.2.2 Altération physique

De nombreux acteurs biotiques tels que **les plantes, les microorganismes ou encore la macrofaune des sols** ont été décrits pour leur contribution à **la désagrégation physique des minéraux**, conduisant à **l'augmentation des surfaces d'échange de ces minéraux et accélérant ainsi leur altération chimique.** A titre d'exemple, **les racines des plantes** en explorant le sol à la recherche de nutriments, pénètrent dans les pores grossiers et fins du sol, voir aussi des roches, conduisant à leur fragmentation (Mottershead *et al.*, 2003). Une autre catégorie particulièrement étudiée d'organismes colonisant les roches et pouvant participer à leur fragmentation, est celle **des lichens** (Banfield *et al.*, 1999). Ces organismes, résultant de la symbiose entre un champignon et des microorganismes phototrophes (algues et cyanobactéries) ou non (bactéries hétérotrophes), pénètrent

les roches et les minéraux qu'ils colonisent *via* les hyphes du champignon, contribuant ainsi à leur désagrégation physique (Banfield *et al.*, 1999). Le corps du lichen appelé thalle et les hyphes du champignon sont soumis aux cycles sécheresse/humidité et gel/dégel ce qui conduit à leur expansion et à leur contraction, ce qui fragmente les roches (Chen *et al.*, 2000 ; Adamo et Violante, 2000). De même, la colonisation des roches par les champignons conduit également à une fragmentation. Tout comme les lichens et les plantes, **les hyphes des champignons** pénètrent les roches au niveau de la zone interfoliaire (espace entre feuillettes d'un silicate), ce qui conduit à leur fracturation (Burford *et al.*, 2003 ; Bonneville *et al.* 2009 ; Fomina *et al.*, 2010). La formation de structure de type « tunnel » a aussi été abordée dans les travaux de Jongmans *et al.*, (1997) et Smit *et al.* (2005). Ces auteurs ont suggéré que la répétition de l'action des hyphes fongiques sur une zone ciblée d'une roche pourrait conduire au cours des siècles à la formation d'un « tunnel », processus publié sous le terme « tunneling », mais cette dernière action ne fait pas consensus auprès de la communauté scientifique.

En dehors de ces organismes qui ont été les plus étudiés, plusieurs études suggèrent aussi l'implication de la macrofaune du sol. **Les vers de terre** contribueraient également à l'altération physique des minéraux. En effet, en ingérant les particules minérales, les vers de terre les concassent (action de frottement des minéraux les uns contre les autres) puis les digèrent contribuant ainsi à la fragmentation des minéraux (Suzuki *et al.*, 2003 ; Carpenter *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2011 ; Lambkin *et al.*, 2011). De même, **les larves de scarabées** (*Protaetia lugubris insperata*) fragmentent les minéraux de part l'action de leur mandibules et plus tard par les frottements de ces minéraux les uns contre les autres dans leur intestin (Suzuki *et al.*, 2003).

2.2.3 Altération chimique

En forêt, notamment, **les arbres et les microorganismes du sol** produisent divers composés organiques et inorganiques dotés de **propriétés altérantes** (Jones, 1998 ; Dakora et Phillips, 2002 ; Jones *et al.*, 2003). Ces différents composés peuvent se fixer directement sur une surface minérale et en mobiliser les éléments ou alors ils peuvent complexer les éléments en solution, modifiant ainsi son équilibre (saturation de la solution) ce qui peut conduire à **l'accélération du taux de dissolution des minéraux**.

- *Production de protons*

La production de protons par les microorganismes du sol et les plantes est une des premières causes de l'altération chimique des minéraux *via* des facteurs biotiques. Tout d'abord, de part leur métabolisme, **les plantes libèrent des protons (H⁺)**. En effet, elles absorbent plus de cations que d'anions, ce qui les conduit à libérer des ions H⁺ afin de maintenir l'équilibre des charges ioniques de leurs cellules. Parmi les nutriments absorbés, la forme d'azote absorbé joue beaucoup sur la charge prélevée. L'azote est le premier élément prélevé en quantité et il se présente sous deux formes, en dehors de l'azote organique : celle d'un cation, NH₄⁺ et celle d'anion, NO₃⁻. Dans des écosystèmes non fertilisés, si la minéralisation de l'azote est stoppée au stade ammonium (NH₄⁺), la plante prélève alors de l'azote sous la forme NH₄⁺. La plante absorbe alors plus de cations que d'anions ce qui entraîne la libération de protons et l'acidification de la rhizosphère (Haynes *et al.*, 1990 ; Turpault *et al.*, 2007).

Par ailleurs, des plantes sont capables « d'adapter » leurs pompes à protons afin de mieux acidifier le milieu en conditions de carence nutritive. Le lupin (*Lupinus albus*) par exemple, produit plus de protons en conditions de carence en phosphore (Yan, 2002). Les **arbres des écosystèmes forestiers** ne font pas exception et libèrent également **des protons dans la rhizosphère pour contrebalancer le prélèvement des cations inorganiques dans le sol** (Hinsinger *et al.*, 2003). Selon les essences d'arbres considérés, le taux de protons libérés n'est pas le même et on a observé que, de façon général, les résineux acidifiaient plus le sol que les feuillus *via* notamment une production plus forte de protons (Augusto *et al.*, 2000). De même que les arbres, **le métabolisme des lichens, des champignons et des bactéries** peut conduire à l'extrusion d'ions H⁺ ce qui entraîne **l'acidification du milieu et l'altération des minéraux en contact avec la solution**.

- *Acides inorganiques*

Les microorganismes du sol produisent des acides inorganiques tels que l'acide sulfurique ou l'acide nitrique par oxydation de composés azotés ou soufrés (Barker *et al.*, 1997). Ces acides inorganiques affectent **la dissolution des minéraux notamment en acidifiant le pH**. Par exemple, le CO₂ produit par les microorganismes (ou les plantes) lors de la respiration, peut réagir avec les minéraux carbonatés ou silicatés et entrainer la production d'acide carbonique altérant ainsi la roche via un processus d'acidification du milieu (Lerman & Wu , 2006 ; Li *et al.*, 2008). La production de tels acides a été révélée au sein de **biofilms microbiens**, entrainant là aussi une chute de pH et donc l'altération de la roche (Berthelin, 1983 ; Berthelin 1985). Enfin, les lichens, en absorbant et en retenant

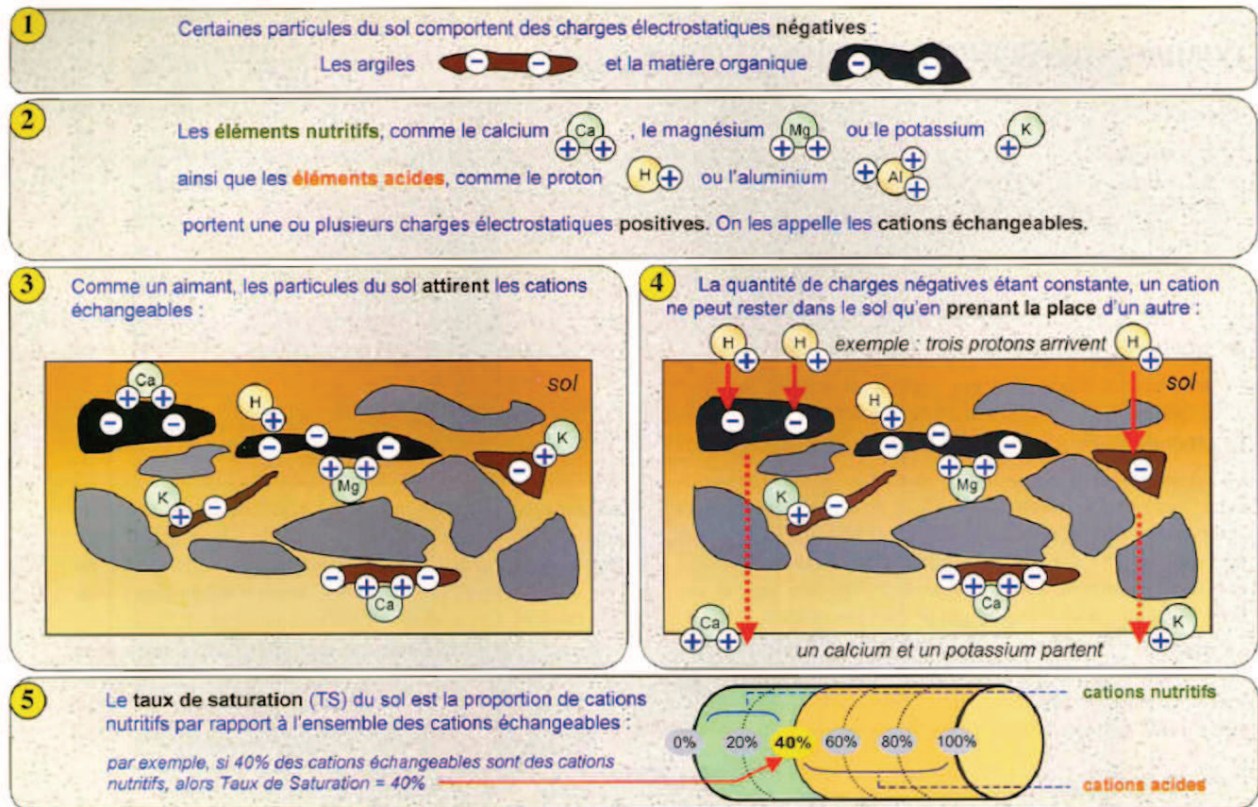


Figure 1.2 : Définition du taux de saturation d'un sol.

D'après Augusto, 2001.

La capacité d'échange cationique (CEC) d'un sol est définie par sa capacité à retenir et à échanger les cations. En d'autres termes, elle exprime, sous des conditions rigoureusement définies, notamment le pH, la quantité potentielle de cations susceptibles de neutraliser les charges négatives du sol (cmol^+/kg). Parmi ces cations on distingue (i) les éléments nécessaires à la nutrition des organismes vivants comme le calcium, le magnésium ou le potassium (cations nutritifs) et (ii) les éléments acides comme le proton ou l'aluminium (cations acides). Le taux de saturation d'un sol (TS) correspond à la proportion de cations nutritifs disponibles/échangeables dans le sol. Le TS et le pH d'un sol sont liés : plus le sol est acide et plus la proportion de cations nutritifs échangeables est faible (Duchaufour, 1983).

l'eau, contribuent à la formation d'acide carbonique ce qui provoque des chutes locales de pH notamment aux abords du thalle (Adamo et Violante, 2000).

- *Acides organiques*

Les racines des arbres et les microorganismes du sol produisent des acides organiques (Drever and Stillings, 1997 ; Jones, 1998 ; Jones *et al.*, 2003) qui peuvent conduire à **la dissolution des minéraux de trois façons différentes** (Drever and Stillings, 1997). Tout d'abord ces acides peuvent **affecter l'équilibre ionique de la solution** et l'acidifier notamment lorsque le pH de la solution est ≤ 5 . Ces acides peuvent également former **des complexes avec les cations en solution et diminuer ainsi le taux de saturation du sol** (proportion de cations nutritifs par rapport à l'ensemble des cations échangeables, Figure 1.2). Enfin, ils peuvent affecter le taux de dissolution des minéraux en formant **des complexes avec des éléments insolubles** et notamment avec l'aluminium (Drever et Stillings, 1997). En effet, ces acides possèdent un ou plusieurs groupes carboxyles (COOH) qui, en réagissant avec le milieu, vont libérer des ions H^+ et/ou former des complexes avec des éléments minéraux (Welch et Ullmann, 1996 ; Bennett *et al.*, 1991). Par exemple, la production d'acide oxalique par les racines va former des complexes avec le fer ou l'aluminium les retirant ainsi de la solution, ce qui va entraîner une dissolution des minéraux contenant du fer et de l'aluminium (Jones, 1998b ; Landeweert *et al.*, 2001 ; Bennett, 2001 ; Mottershead, 2003). Une étude en conditions *in vitro* a démontré que les acides oxalique, malique et/ou citrique étaient capables d'induire la dissolution de la kaolinite $[Al_2Si_2O_5(OH)_4]$ (Wang *et al.*, 2005). De la même façon l'acide oxalique et/ou citrique, produit par les champignons, forme des complexes avec les macroéléments en solution contribuant ainsi à l'altération d'un minéral tel que la biotite $[K(Mg,Fe)_3(OH,F)_2(Si_3AlO_{10})]$ (Balogh-Brunstad *et al.*, 2008). Les bactéries produisent également des acides organiques tels que l'acide gluconique, 2-keto-gluconique, acétique, lactique, malique, succinique, oxalique ou encore citrique (Bolan *et al.*, 1994). Un lien entre la production de l'acide gluconique et l'altération de la bytownite $[(Ca,Na)(Si,Al)_4O_8]$ a été démontré pour une souche bactérienne appartenant au genre *Burkholderia* (Welch et Ullmann, 1999). De même, Frey *et al.* (2010) ont observé que la dissolution d'un granite conditionné en poudre sous l'action de bactéries s'accompagnait de la production d'acide oxalique. Les **lichens** produisent également des acides organiques tels que l'acide oxalique, mais ils sécrètent aussi des **composés phénoliques appelés « lichens acids »** (depsides et depsidones ; Seshadri, 1944) et qui forment des **complexes avec les cations métalliques présents à la surface des minéraux contribuant ainsi à leur altération** (Adamo et Violante, 2000 ; Chen, 2000).

- *Molécules chélatrices*

Des molécules chélatrices telles que les **sidérophores** ont été démontrées comme participant à l'altération des minéraux. Les sidérophores ont une forte affinité pour le fer (Fe^{3+}), et peuvent également fixer le cuivre, le manganèse ou le zinc (Brantley *et al.*, 2001 ; Kalinowski *et al.*, 2004). Il existe plus de 200 sidérophores identifiés, néanmoins on peut les distinguer en deux classes : les hydroxamates et les catécholates. Les sidérophores hydroxamates sont retrouvés chez les bactéries, les plantes et les champignons et **augmentent significativement la dissolution des minéraux silicatés** contenant des hydroxydes de fer en conditions *in vitro* (Watteau et Berthelin, 1994). D'autre part, les sidérophores catécholates forment des **liaisons très fortes avec la surface des minéraux et des métaux et augmentent également la dissolution des minéraux silicatés** en conditions *in vitro* (Barker *et al.*, 1997). L'implication de sidérophores, de type catécholate, dans la dissolution de l'hornblende $[(\text{Ca},\text{Na},\text{K})_2(\text{Mg},\text{Fe}^{2+},\text{Fe}^{3+},\text{Al})_5 (\text{Si}_6(\text{Al},\text{Si})_2\text{O}_{22})(\text{OH},\text{F})_2]$ a été démontrée pour une souche de *Streptomyces sp.* en conditions *in vitro* (Liermann *et al.*, 2000). Enfin, il a également été démontré que de telles molécules peuvent **former des complexes avec les ions Al^{3+} contribuant ainsi à la dissolution des minéraux porteurs de ces éléments chimiques** (Watteau et Berthelin, 1994 ; Barker *et al.*, 1998).

En dehors des sidérophores, les racines, les bactéries et les champignons produisent aussi des **exopolysaccharides** (Barker *et al.*, 1997, Dakora et Phillips, 2002 ; Dennis, 2010) qui peuvent contribuer à la **dissolution des minéraux** de quatre façons différentes :

- (i) en **agrégeant les particules de sol** (Denef *et al.*, 2002).
- (ii) en retenant l'eau *via* leur propriété d'anti-dessiccation (Barker *et al.*, 1997) et donc en **augmentant le contact minéral/solution**.
- (iii) en **permettant la diffusion des éléments** même lorsque le taux d'humidité est faible (Chenu et Roberson, 1996).
- (iv) en permettant la **néoformation de minéraux secondaires** (Barker and Banfield, 1996 ; Fortin *et al.*, 1997).
- (v) en **chélatant les éléments minéraux**. Par exemple, la production de gomme xanthine par *Xanthomonas campestris* induit la dissolution de la bytownite $\{(\text{Ca},\text{Na})[\text{Al}(\text{Al},\text{Si})\text{Si}_2\text{O}_8]\}$ (Welch *et al.*, 1999).

- *Mécanismes d'oxydo-réduction*

Contrairement aux eucaryotes qui utilisent l'oxygène comme accepteur d'électrons pour leur respiration, les bactéries sont capables d'utiliser d'autres **accepteurs tels que le nitrate, le fer, le manganèse ou encore l'arsenic** (Nealson et Stahl, 1997 ; Sasaki *et al.*, 1998 ; Weiss *et al.*, 2004). Les bactéries comme *Shewanella oneidensis* (Lower *et al.*, 2001) ou *Geobacter sulfurreducens* (MacDonald *et al.*, 2011) par exemple, sont capables d'altérer des minéraux comme la goethite [$\text{Fe}^{+3}\text{O}(\text{OH})$] ou la ferrihydrite [$\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_3 \cdot 0.5(\text{H}_2\text{O})$]. De tels mécanismes impliquent un contact direct avec la surface des minéraux (Newman, 2001).

D'autre part, en exsudant des **composés aliphatiques et phénoliques, les arbres peuvent modifier les conditions d'oxydo-réduction** au sein de la rhizosphère (Dakora et Phillips, 2002 ; Dennis, 2010). Si on prend l'exemple du fer, en condition aérobie et à un pH proche de la neutralité, sa forme réduite Fe^{2+} (ion fer ferreux) est très soluble tandis que sa forme oxydée Fe^{3+} (ion fer ferrique) ne l'est que très peu (Stone, 1997). L'exsudation racinaire induit donc des changements dans la solubilité des nutriments inorganiques ce qui, indirectement, **influe sur le taux de dissolution des minéraux**.

- *Action de la macrofaune du sol*

Parallèlement à tous ces composés sécrétés par les plantes et les microorganismes, la macrofaune du sol telle que **les vers de terre ou les scarabées altèrent également les minéraux en les « digérant »**. Plusieurs études ont montré qu'après avoir été digérés, les minéraux étaient plus lisses et plus ronds que lors de leur ingestion (Suzuki *et al.*, 2003 ; Carpenter *et al.*, 2007). Ceci pourrait éventuellement s'expliquer par le pH des intestins qui est acide dans la plupart des organismes. Cependant, Liu *et al.* (2011) ont démontré que les minéraux digérés et altérés présentaient différentes communautés bactériennes. Les chercheurs ne savent pas encore si ce phénomène doit être attribué aux enzymes digestives de ces organismes ou aux bactéries habitant leurs intestins (Suzuki *et al.*, 2003 ; Carpenter *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2011).

Ainsi, les différents organismes du sol contribuent à l'altération des minéraux de part leur contribution à la désagrégation physique et notamment, de part les réactions chimiques qu'ils engendrent directement ou indirectement via les différents composés qu'ils sécrètent. Cependant, au cours des dernières décennies, l'altération minérale en forêt a surtout été attribuée à l'activité des champignons symbiotiques (Paris *et al.*, 1996 ; Jongmans, 1997 ; Landeweert, 2001 ; Gadd, 2007). *Ce constat tient essentiellement au fait que les recherches se sont uniquement concentrées sur ces*

microorganismes. Par conséquent, les données relatives à l'identité taxonomique et aux capacités fonctionnelles des communautés bactériennes des sols forestiers capables d'altérer les minéraux, ainsi que leur contribution n'est pas très bien connue. Au cours de ma thèse, je me suis concentrée sur ces communautés et sur leur rôle dans l'altération minérale.

2.3. L'altération bactérienne en forêt

2.3.1 Effet sélectif de la rhizosphère et de la mycorhizosphère sur les communautés bactériennes du sol

A ce jour, nos connaissances sur les caractéristiques taxonomiques et fonctionnelles des communautés bactériennes impliquées dans l'altération des minéraux ainsi que leur localisation dans le sol des écosystèmes forestiers sont relativement limitées. Ce manque de connaissance tient en grande partie au fait que le sol est un environnement complexe. **La matrice sol est caractérisée par son hétérogénéité et est constituée de nombreux « sous-systèmes » considérés d'un point de vue microbiologique comme autant de niches ou habitats propices au développement des bactéries telles que le sol global (sans racines), la rhizosphère¹ ou encore la mycorhizosphère².** Ces deux niches constituent des environnements spécifiques où les échanges de matière et d'énergie entre le sol et les arbres sont très intenses, ce qui peut influencer non seulement les conditions physico-chimiques du sol mais aussi la flore bactérienne (Blum *et al.*, 2002 ; van Schöll *et al.*, 2008 ; Koele *et al.*, 2009). Dans la rhizosphère et la mycorhizosphère, l'arbre absorbe l'eau et les nutriments nécessaires à sa croissance et, dans le même temps, libère divers composés organiques (rhizodéposition) tels que des acides organiques, des acides aminés, des sucres, des stérols, des facteurs de croissance, des vitamines ou encore des enzymes (Dakora & Phillips, 2002 ; Dennis *et al.*, 2010). **La rhizodéposition favorise la colonisation de la racine (rhizosphère et mycorhizosphère) des arbres par des microorganismes spécifiques (champignons et bactéries).** En effet, il a été démontré que les microorganismes et notamment, les communautés bactériennes, colonisant la rhizosphère et la mycorhizosphère présentaient une structuration fonctionnelle et taxonomique différente de celles du sol environnant suggérant ainsi un effet 'niche' (Starkey, 1958 ; Badri *et al.*, 2009 ; Dennis *et al.*, 2010). L'étude des interactions entre ces microorganismes (bactéries, champignons) et l'arbre (Starkey, 1958) a démontré qu'ils jouaient un rôle important dans sa nutrition, et notamment dans les milieux pauvres en nutriments tels que les écosystèmes forestiers des régions tempérées. **Ces microorganismes sont effectivement capables d'améliorer la nutrition de la plante via notamment leur capacité d'altération qui joue un rôle dans la mise en disponibilité des nutriments tels que le phosphore,**

le potassium ou le magnésium (Starkey, 1958 ; Goldstein *et al.*, 1999 ; Calvaruso *et al.*, 2006 ; Richardson & Simpson, 2011).

Au cours de la dernière décennie, des études ont démontré que **la rhizosphère et la mycorhizosphère des plantes étaient colonisées par des communautés bactériennes ayant la capacité d'altérer les minéraux**. Des souches bactériennes capables d'altérer les minéraux ont effectivement été retrouvées dans la rhizosphère de mangrove (Vazquez *et al.*, 2000), d'arbres de forêt tempérées (Leyval and Berthelin, 1991 ; Calvaruso *et al.*, 2006 ; Collignon *et al.*, 2011) et dans la mycorhizosphère de chêne associée au champignon symbiotique *Scleroderma citrinum* (Uroz *et al.*, 2007).

¹Qualifie le volume de sol influencé par les racines.

²Qualifie le volume de sol influencé par les racines en association avec des champignons symbiotiques (dits mycorhiziens)

2.3.2 Influence de l'essence d'arbre sur la capacité d'altération des communautés bactériennes du sol

Notre connaissance actuelle des sols forestiers acides suggère, en général, un enrichissement des communautés bactériennes capables d'altérer les minéraux dans la rhizosphère et la mycorhizosphère des arbres (Calvaruso *et al.*, 2007, 2010 ; Uroz *et al.*, 2007, 2009, 2010 ; Leyval and Berthelin, 1991). Cependant, l'essence d'arbre semble être un facteur déterminant dans la structuration de ces communautés. Une récente étude a, en effet, démontré que les communautés bactériennes provenant de la rhizosphère de hêtre ou de chêne étaient potentiellement plus altérantes que celles provenant de la rhizosphère d'épicéa (Calvaruso *et al.*, 2010). De même, Collignon *et al.* (2011) ont observé un effet structurant sur la capacité d'altération des communautés bactériennes dans la rhizosphère de hêtre mais pas dans celle de l'épicéa. L'épicéa étant un conifère, il acidifie plus le sol (Augusto *et al.*, 2000) et ce, notamment parce qu'il libère plus de protons dans le sol. Ces résultats suggèrent que la quantité de protons, et donc que le pH du sol, serait un acteur régulant la capacité d'altération des communautés bactériennes rhizosphériques. Comme vu précédemment, un pH plus acide suggère une dissolution des minéraux plus rapide et donc une disponibilité en nutriment plus importante. L'épicéa serait donc capable par lui-même de rendre disponible les nutriments, ce qui expliquerait la non sélection de communautés bactériennes altérantes au sein de sa rhizosphère par rapport au sol environnant.

2.3.3 Influence de la saison sur la capacité d'altération des communautés bactériennes du sol

En plus de l'influence du compartiment (rhizosphère, mycorrhizosphère, sol environnant) et de l'effet de l'essence d'arbre (épicéa, hêtre, chêne) sur la structuration fonctionnelle des communautés bactériennes capables d'altérer, Collignon *et al.* (2011) ont récemment démontré un effet saisonnier. En comparant la capacité d'altération de souches bactériennes isolées de la rhizosphère et du sol environnant à chacune des saisons, ils ont démontré que ces communautés présentaient un potentiel d'altération plus efficace en automne qu'au printemps. Ces résultats combinés avec l'effet essence abordé précédemment, suggèrent un effet de la physiologie de l'arbre sur la structuration fonctionnelle de ces communautés. A l'approche de l'hiver, l'arbre augmenterait sa demande en nutriment, appauvrissant ainsi le sol à proximité des racines, en conséquence, l'arbre sélectionnerait plus de bactéries capables d'altérer afin de répondre à ses besoins nutritifs.

2.3.4 L'influence potentielle de la disponibilité en nutriments

Un nutriment est dit « biodisponible » s'il est facilement échangeable et, donc assimilable, par les organismes et notamment par les arbres. La biodisponibilité en nutriments d'un sol est directement liée à sa CEC, à son taux de saturation et à son pH (Figure 1.2). L'impact du compartiment, de l'essence d'arbre et de la saison sur la structuration fonctionnelle des communautés bactériennes du sol suggèrent l'hypothèse que la disponibilité en nutriment pourrait être un facteur structurant des communautés bactériennes capables d'altérer les minéraux dans le sol des écosystèmes forestiers. Un des moyens de tester cette hypothèse serait d'analyser le potentiel d'altération de ces communautés après un amendement minéral en poudre pour permettre une mise en disponibilité plus rapide des nutriments inorganiques contenus dans le minéral. Cependant très peu d'études se sont penchées sur le sujet. Une étude sur des champignons mycorrhiziens isolés de parcelles chaulées ou non avec de la dolomie [CaMg(CO₃)₂], n'a montré aucune différence significative dans leur capacité à mobiliser le fer (Rineau and Garbaye, 2010). Une étude plus récente a démontré qu'après un chaulage à long terme (30 ans) avec de la dolomie [CaMg(CO₃)₂], les communautés bactériennes d'un sol chaulé présentaient un potentiel d'altération plus efficace que celles provenant d'un sol non chaulé (Uroz *et al.*, 2011a). Les résultats de cette étude sont plutôt inattendus mais résultent d'un effet indirect du chaulage. A long terme, le chaulage induirait des carences nutritives dans le sol (Tyler and Olsson, 2001 ; Uroz *et al.*, 2011a). Ces carences nutritives seraient en grande partie dues à l'accélération de la physiologie de la plante. En effet, le sol étant devenu subitement plus riche en nutriments, la plante en a prélevé de plus

en plus durant sa croissance, appauvrissant davantage le sol qu'il ne l'était avant le chaulage (Uroz *et al.*, 2011a). Tous ces résultats suggèrent bien l'hypothèse que la disponibilité en nutriment aurait un impact sur la capacité d'altération des communautés bactériennes du sol. Cependant, à l'heure actuelle, ce lien reste à l'état de suggestion.

3. Article: Bacterial weathering and its contribution to nutrient cycling in temperate forest ecosystems

S. Uroz, P. Oger, C. Lepleux, C. Collignon, P. Frey-Klett and M.-P. Turpault

Publié dans Research in Microbiology, Volume 162, Issue 9, November 2011, Pages 820-831

Résumé

Contrairement aux cultures agricoles, les forêts, poussant sur des sols acides, sont un des écosystèmes terrestres les moins influencés ou fertilisés par l'Homme. Ces forêts développées sur sol acide sont caractérisées par un stock important de nutriments inorganiques piégés dans des minéraux peu altérables. Dans ce contexte, les processus de l'altération minérale sont importants d'autant plus que les éléments nutritifs contenus dans les minéraux du sol ne sont pas directement accessibles aux racines des arbres. A l'heure actuelle, plusieurs genres bactériens ont été identifiés comme étant capables d'altérer les minéraux et dans certains cas, d'augmenter la nutrition des arbres. Cependant, peu d'études se sont concentrées sur ces communautés bactériennes capables d'altérer les minéraux en prenant en compte leur origine écologique, les essences d'arbres associées, les cycles biogéochimiques, les caractéristiques du sol ou encore les techniques de gestion forestières. Cette revue vise à discuter de l'hétérogénéité du processus de l'altération minérale dans les sols forestiers et à présenter l'état actuel des connaissances sur les caractéristiques taxonomiques et fonctionnelles des bactéries altérantes ainsi que les différentes niches du sol où elles ont été isolées. L'influence des facteurs abiotiques et biotiques sur la distribution de ces communautés bactériennes sera discutée en traitant notamment de l'impact de l'essence d'arbre ou des pratiques de gestion sylvicoles.



ELSEVIER



Research in Microbiology 162 (2011) 820–831



www.elsevier.com/locate/resmic

Bacterial weathering and its contribution to nutrient cycling in temperate forest ecosystems

Stéphane Uroz ^{a,b,*}, Phil Oger ^c, Cendrella Lepleux ^{a,b}, Christelle Collignon ^{a,b}, Pascale Frey-Klett ^a, Marie-Pierre Turpault ^b

^a INRA, UMR 1136 INRA Nancy Université "Interactions Arbres Micro-organismes", Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France

^b INRA UR 1138 "Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers", Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France

^c CNRS/ENS, UMR 5570, Laboratoire des Sciences de la Terre Ecole Normale Supérieure 46, Allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex, France

Received 8 October 2010; accepted 11 January 2011

Available online 22 February 2011

Abstract

Unlike farmland, forests growing on acidic soils are among the terrestrial ecosystems that are the least influenced or amended by man. Forests which developed on acidic soils are characterized by an important stock of inorganic nutrients entrapped in poorly weatherable soil minerals. In this context, the mineral-weathering process is of great importance, since such minerals are not easily accessible to tree roots. To date, several bacterial genera have been noted for their ability to weather minerals and, in the case of some of them, to improve tree nutrition. Nevertheless, few studies have focused their analyses on mineral-weathering bacterial communities in relation to geochemical cycles and soil characteristics, their ecological origin, associated tree species and forest management practices. Here we discuss the heterogeneity of the mineral-weathering process in forest soils and present what is known concerning the taxonomic and functional characteristics of mineral-weathering bacteria, as well as the different locations where they have been isolated in forest soils. We also discuss the biotic and abiotic factors that may influence the distribution of these bacteria, such as the effect of tree species or forest management practices.

© 2011 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Mineral-weathering; Forest; Soil; Bacterial communities; Nutrient cycling; Pyrosequencing

1. Introduction

Historically, soils with high plant nutritional capacity have been dedicated to agriculture and intensively exploited. In contrast, nutrient-poor soils have been abandoned to forest ecosystems. In temperate regions, forests are among the terrestrial ecosystems the least amended by Man as compared to farmland. Mineral amendment (liming) for economic reasons remains a rare sylvicultural practice. However, in the 21st century, forest ecosystems are facing intensified exploitation, and the maintenance of both soil capacity for production and the quality of the environment is a central issue in

sustainable forest management (Nambiar, 1997). Harvesting trees leads to removal of nutrients collected from the soil by trees during their lifetime (40–120 years depending on the tree species), causing potential deficiencies if removal of nutrients through harvesting is higher than replenishment of soil reserves through natural processes (Ranger and Turpault, 1999). In this context, the question arises as to how trees collect the nutritive cations they need for sustainable growth, and what are the sources of these inorganic nutrients. Aside from the contribution of rainwater, atmospheric deposits and recycling of elements contained in falling leaves and dead roots, soil minerals (primary and secondary) constitute the main source of inorganic nutrients for long-lasting functioning of forest ecosystems. Notably, temperate forests, which develop on acidic soils, in contrast to agricultural soils, are characterized by an important stock of nutritive cations entrapped in soil minerals. However, these soil minerals are

* Corresponding author. INRA, UMR 1136 INRA Nancy Université, Interactions Arbres Micro-organismes, Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France. Tel.: +33 3 83 39 40 81; fax: +33 3 83 39 40 69.

E-mail address: uroz@nancy.inra.fr (S. Uroz).

poorly weatherable, so their inorganic nutrients are not easily accessible to tree roots. In other words, trees are placed in a situation of ‘famine in a land of plenty’ (Dancis et al., 1990). The release of key nutritive cations from soil minerals by mineral-weathering processes is thus of great importance for the sustainability of forest ecosystems growing on acidic soils.

It is now well established that mineral-weathering is controlled by chemical, hydrological, physical and biological processes, as well as by soil characteristics. Soil minerals are subjected to mechanical erosion, but also to both thermal (temperature fluctuations) and hydration (water circulation) effects. The dissolution rate of minerals is also strongly correlated with the concentration of mineral-weathering agents such as protons, organic and inorganic acids, chelating compounds (e.g. siderophores) and soil pH. Mineral-weathering can also be initiated and/or accelerated by biotic factors such as plant roots and soil microorganisms (White and Brantley, 1995; Drever, 2005; Gregory and Hinsinger, 1999). Tree roots, through organic acid production and the physical force they exert on soil minerals, enhance mineral-weathering. Furthermore, symbiotic mycorrhizal fungi associated with tree root systems can release inorganic nutrients from minerals such as apatite or biotite and transfer these nutrients to the trees, thus contributing to tree nutrition (Blum et al., 2002; Courty et al., 2010; Wallander, 2000). For decades, mineral-weathering by forest soil microorganisms has mainly been attributed to mycorrhizal fungi (Paris et al., 1996; Landeweert et al., 2001), largely overlooking the role that other associated microorganisms may play. As a consequence, comparatively little is known about the relative importance of bacterial communities that are associated with tree roots and/or soil minerals in forest soil mineral-weathering processes. In this article, we summarize recent progress in understanding microbial weathering processes in temperate forest ecosystems, focusing mainly on bacterial communities.

2. Nutrient cycling in the forest soil rhizosphere, a niche of particular interest

Nutrient cycling in forest soil is strongly linked to nutrients derived from organic matter degradation and from mineral-weathering processes. To illustrate the heterogeneity of soil processes related to mineral-weathering, several studies have attempted to focus mainly on targeted zones of the soil such as the rhizosphere, the mycorrhizosphere or bulk soil using different strategies. Using pure and calibrated minerals conditioned in mesh bags and introduced into the soil, Augusto et al. (2000) reported that coniferous species (Norway spruce, *Picea abies*; Scots pine, *Pinus sylvestris*) promoted significantly more mineral-weathering than hardwood trees, suggesting an impact of the tree species. In another experiment based on the same approach, Turpault et al. (2009) tested the hypothesis that mineral stability could be influenced by tree root proximity, i.e. the rhizosphere. Using fluoroapatite and labradorite plagioclase introduced into the soil of mature beeches (*Fagus sylvatica*), those authors highlighted that, in acidic soils, the minerals were significantly more weathered in the rhizosphere zone than in a zone where roots were excluded. Similarly, by combining

mineralogical and chemical analysis, Calvaruso et al. (2009) demonstrated that the dissolution of clay-sized minerals – the soil fraction that is most reactive and richest in nutrients – was higher in the rhizosphere of Norway spruce and oak than in the surrounding bulk soil and that this was due to massive production of protons by the roots. Similarly, Séguin et al. (2005) observed that several minerals were depleted from the clay fraction of the poplar (*Populus tremuloïdes*) rhizosphere compared to the surrounding bulk soil. A similar increase in clay weathering of the rhizosphere environment was observed for non-perennial plants such as ryegrass (Hinsinger and Jaillard, 1993). Notably, it was revealed that more cations were released in the mycorrhizosphere of subalpine fir (*Abies lasiocarpa*) than in the surrounding bulk soil, suggesting an impact of mycorrhizal symbiosis (Arocena and Glowa, 2000). Unfortunately, the presence and relative impact of mineral-weathering bacterial communities associated with the mycorrhizal roots was not evaluated in this study. However, this rhizosphere effect on minerals can be canceled or attenuated in limed conditions. Turpault et al. (2009) demonstrated that there was no increase in mineral-weathering in the rhizosphere zone when the forest stand was fertilized with calcium. These results suggest that the mineral-weathering process is increased in the tree root vicinity and that rhizospheric activities (i.e. root physiology and root-associated microorganisms) acting on the mineral-weathering process may be regulated by nutrient availability. In other words, when enough inorganic nutrients are available in the rhizosphere, the biotic factors inhabiting this soil environment do not need to extract these nutrients from soil minerals.

3. Mineral-weathering bacteria

Many organisms and microorganisms such as plants, algae, lichens, fungi and bacteria can colonize rock surfaces or soil minerals, especially pores and cracks, but their relative impact on the global mineral-weathering process is difficult to discriminate from purely abiotic processes (Landeweert et al., 2001; Uroz et al., 2009a). Despite this, it is now well established that mineral-weathering can be accelerated and even initiated by microorganisms. The role of fungi in mineral-weathering was highlighted in the last few decades, and more recently, it was evidenced that bacterial communities can impact mineral stability, leading to the release of inorganic nutrients (Calvaruso et al., 2006). To date, a large range of bacterial strains or communities from diverse genera have been reported to be able to colonize mineral surfaces and/or to weather minerals, and for some of them a plant growth-promoting effect was demonstrated (Fig. 1). The proven or hypothesized mechanisms used by bacteria to weather minerals include several oxidoreduction and dissolution reactions, as well as the production of weathering agents, such as protons, organic acids and chelating molecules.

3.1. Phylogenetic affiliation of known mineral-weathering and mineral colonizing bacteria

Two main approaches have been developed in parallel to characterize the relationship between bacteria and minerals.

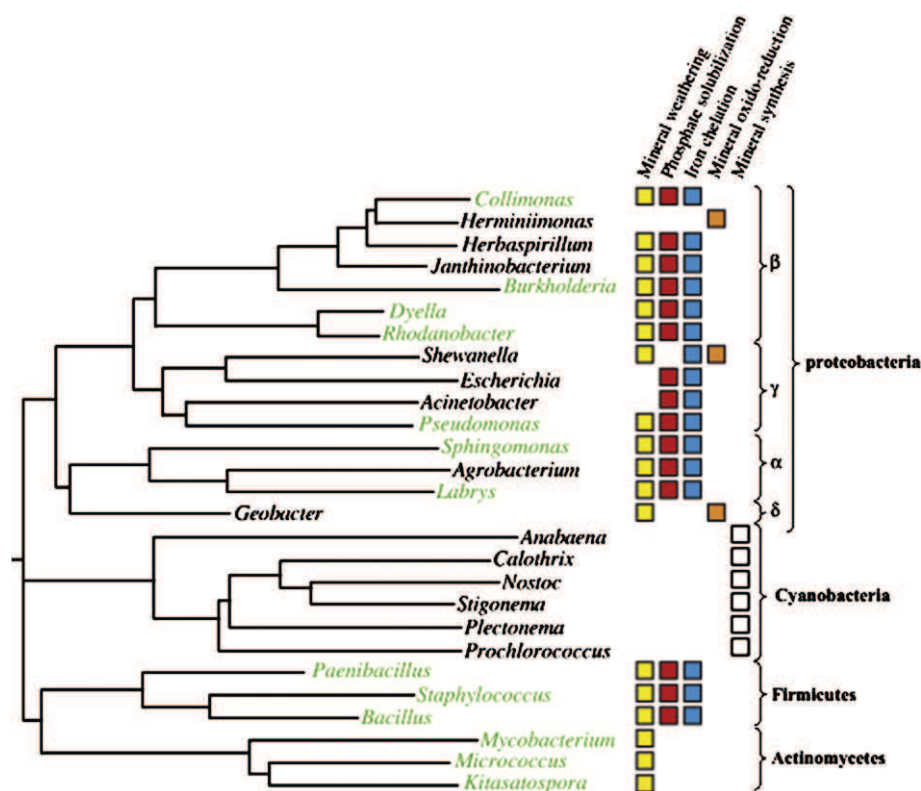


Fig. 1. Neighbor-joining tree showing the placement of some bacteria characterized for their ability to solubilize or produce minerals in the bacterial tree of life. Bacterial genera in which bacterial strains known for their ability to weather minerals, to solubilize inorganic phosphorous, to chelate iron, to perform mineral oxidoreduction or to synthesize minerals are presented with yellow, red, blue, orange and white squares, respectively. The genera in which bacterial strains have been isolated from forest ecosystem are presented in green. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

The first attempts to answer the question “what is where?” while the second question addresses “what is doing what?”. From these two inquiries, much information concerning the identity of the bacterial communities colonizing mineral surfaces and their distribution has been obtained, but less has been revealed concerning their mineral-weathering ability.

Many studies have observed the development of complex microbial biofilms on the surface of minerals (Gorbushina and Broughton, 2009). It is now well established that cyanobacteria are among the first settlers colonizing mineral surfaces. This is probably due to their ability to photosynthesize and fix atmospheric nitrogen. Diverse species such as *Anabaena*, *Calothrix*, *Nostoc*, *Prochlorococcus* and *Stigonema* have been reported on rock surfaces (Gorbushina and Broughton, 2009; Herrera et al., 2009; Olsson-Francis et al., 2010; Kelly et al., in press). Thorseth et al. (1992) hypothesized that when rocks are exposed to sufficient light for photosynthesis, cyanobacterial growth could create local changes in pH that cause mineral-weathering. However, although cyanobacteria have been detected on the top layer of forest soil, their mineral-weathering ability remains unknown (Demba Diallo et al., 2004). Besides cyanobacteria, heterotrophic bacteria colonizing minerals or capable of weathering minerals have been described by cultivation-dependent and -independent approaches. Most of the culture-independent studies have addressed the taxonomic identities of bacteria or archaeobacteria associated with rock

surfaces and oceanic basalts or found in groundwater systems (Bennett et al., 1996; Cockell et al., 2009; Herrera et al., 2008; Santelli et al., 2008; Hutchens, 2009; Hutchens et al., 2010). Although the mineral-weathering ability of rock-associated microbial communities remains unknown, we may hypothesize a functional adaptation to these oligotrophic conditions and thus a mineral-weathering ability for some of them. As an example, comparative genomics suggested that archaeobacteria might be involved in metal transformation (Bini, 2010). Thanks to cultivation-dependent approaches, a large range of Gram-negative and Gram-positive bacteria (Fig. 1; Uroz et al., 2009b) originating mostly from soil were proven to be able to solubilize inorganic phosphorus, mobilize iron and weather complex minerals.

3.2. Mineral-weathering ability of the *Burkholderia* and *Collimonas* genera

Several bacterial strains have been isolated from forest soils and characterized for their ability to weather minerals using a microplate assay (Uroz et al., 2007, 2009a,b; Calvaruso et al., 2010; Fig. 2A). The most efficient bacteria identified so far belong to the *Burkholderia* and *Collimonas* genera, which belong to the Beta-Proteobacteria phylum and are frequently found in acidic and nutrient-poor soils. Bacteria from the *Burkholderia* genus were previously known for their

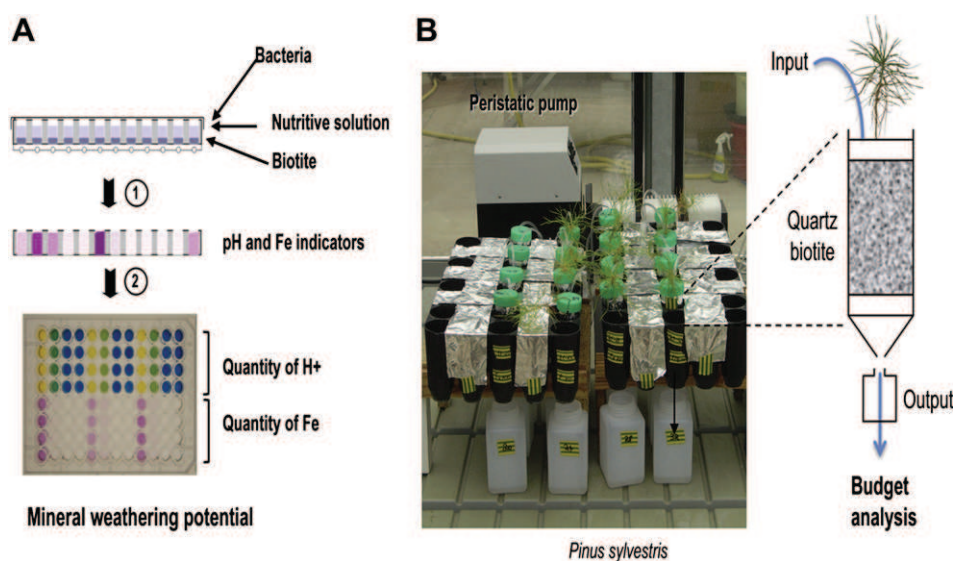


Fig. 2. Methods for measuring mineral-weathering. A. Microplate assay. A calibrated bacterial suspension is transferred to a well of sterile Multiscreen microplate (Millipore®) containing sterile biotite particles and a nutritive solution (BHm medium), lacking iron and supplemented with a carbon substrate (2 g/L). After 48 h incubation at 25 °C with constant shaking, the liquid of each well is filtered at 0.22 μm by centrifugation. To assess biotite weathering (1), the filtrates are recovered in a new microplate, containing Ferrospectral for Fe quantification and bromocresol green for pH measurement. The amounts of Fe and protons released are measured at A_{595nm} (2) and compared with a calibration curve. This corresponds to the mineral-weathering potential of each bacterial isolate (Uroz et al., 2007). B. Microcosm experiments. After 6 weeks of growth in a greenhouse, the roots of Scots pine seedlings (*P. sylvestris*), inoculated or not with a mycorrhizal fungus, are washed in sterile ultrapure water to remove adhering growth substrate. Seedlings are weighed individually. The seedlings are then introduced in sterile microcosms containing a mixture of biotite (0.5–1 mm diameter) and quartz (0.5–2 mm). The seedlings are fed by a deficient nutrient solution devoid of potassium and magnesium (these inorganic nutrients are only present into the biotite) through a peristaltic pump. Then a concentration of 4×10^7 CFU/mL of bacterial inoculum is added. After 80 days, all pine seedlings are sampled to observe root morphology and to quantify their final biomass and mineral content and the weathering budget is determined according to Calvaruso et al. (2006). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

ability to solubilize inorganic phosphate (Kim et al., 2005; Lin et al., 2006) and to mobilize iron through the production of siderophores (Vial et al., 2007). The ability to weather complex minerals and rocks such as biotite, basalt, or granite (Uroz et al., 2007; Wu et al., 2007, 2008) was more recently reported for bacterial strains belonging to the *Burkholderia glathei* and *Burkholderia fungorum* species. One of the most interesting bacterial genera concerning the mineral-weathering process remains *Collimonas*. This genus was previously described as being able to grow at the expense of living fungal hyphae (mycophagy), to hydrolyze chitin (de Boer et al., 2004) and, more recently, to be preferentially associated with fungi (Männistö and Häggblom, 2006; Offre et al., 2007; Uroz et al., 2007). Thus, *Collimonas* was mainly recognized as a fungal-associated genus (Leveau et al., 2009).

Collimonas were identified in soils with a low nutrient availability and on mineral surfaces, which suggested they were likely to be adapted to oligotrophic conditions (Herrera et al., 2008; Uroz et al., 2007, 2009b, 2010). This hypothesis was confirmed by quantitative PCR experiments (Höppener-Ogawa et al., 2007; Leveau et al., 2009), which demonstrated that the abundance of *Collimonas* was significantly higher in the mineral than in the organic layer of forest soils. Notably, a small-scale biogeographic analysis (Uroz et al., 2009b) demonstrated that *Collimonas* originating from nutrient-poor ecosystems (forest soils, coastal dunes) or rich ecosystems characterized by low nutrient availability (tundra soils, heathland) (Männistö and Häggblom, 2006;

Uroz et al., 2007, 2009a,b; Leveau et al., 2009) were all very efficient in weathering a ubiquitous soil mineral, biotite. All the tested *Collimonas*, regardless of their ecological origin, showed high mineral-weathering potential (i.e. amount of Fe released from biotite). Interestingly, the mineral-weathering efficacies of the *Collimonas* originating from tundra appeared to be significantly lower than those of dune and acidic forest soils (Uroz et al., 2009b). However, the analysis of these data did not allow discrimination of different ecotypes among the *Collimonas* strains.

Phylogenetic analyses demonstrated that the ability to weather minerals was a common functional trait of all identified (*Collimonas fungivorans*, *Collimonas arenae*, *Collimonas pratensis*) or unidentified *Collimonas* species (Leveau et al., 2009; Uroz et al., 2009b). Moreover, all *Collimonas* appeared capable of solubilizing inorganic phosphate and mobilizing iron (Uroz et al., 2009b). Notably, high concentrations of gluconic acid were detected in culture supernatants of the *Collimonas*, which may partly explain their mineral-weathering efficacy. Indeed, this glucose-derivative metabolite is among the few metabolites suspected of being involved in the mineral-weathering effect of heterotrophic bacteria (Kim et al., 2005; Lin et al., 2006). In contrast, bacterial strains belonging to closely related *Herbaspirillum* and *Janthinobacterium* genera were inefficient or poorly efficient in weathering biotite. From an evolutionary point of view, the ability of *Collimonas* to use specific fungal-derivative metabolites, to colonize poor nutrient environments and to

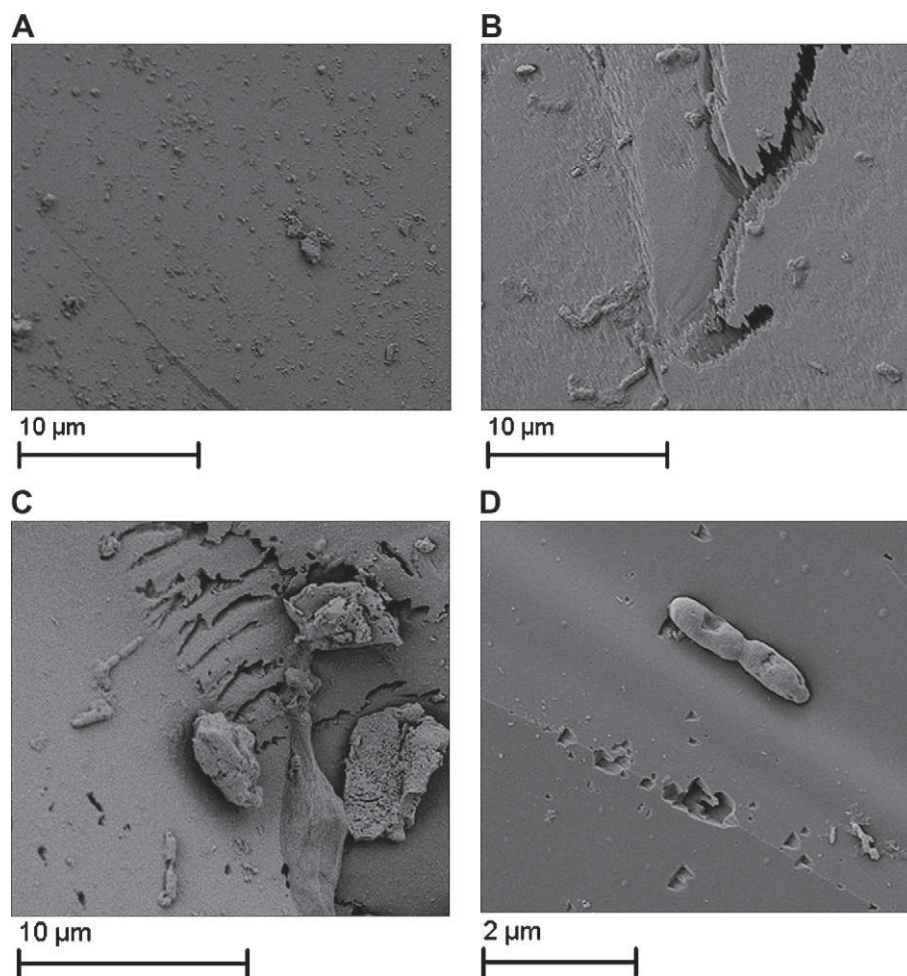


Fig. 3. Bacteria colonizing apatite particles. Apatite particles were incubated for 48 h with an efficient mineral-weathering bacterium (*Burkholderia glathei* PML1(12)). Samples were then fixed in 2.5% glutaraldehyde phosphate-buffered saline and observed using a scanning electron microscope. (A,B): Particles incubated without (left) or with (right) strain PML1(12). (B): The surface shows extensive surface alteration and etches/pits formed by apatite dissolution. (C,D): Bacteria on the mineral surface.

efficiently weather minerals suggests an adaptive evolution of the *Collimonas* genus to oligotrophic conditions. Based on these findings in forest soils, *Collimonas* and, to a lesser extent *B. glathei*, could be considered, in the absence of currently identified marker genes of the mineral-weathering function, as bioindicators of soil status (oligotrophic environment) and bacterial weathering potential. In this sense, recent use of pyrosequencing confirmed that *Burkholderia* is a major genus in forest soil and, moreover, that it is enriched in the tree rhizosphere, confirming the selection of efficient mineral-weathering bacteria by trees (Uroz et al., 2010). In contrast, the *Collimonas* genus is comparatively rare amongst microbial communities but is functionally important.

3.3. Plant growth-promoting effect of mineral-weathering bacteria

In forest ecosystems it is difficult to quantify the effect of efficient mineral-weathering bacteria on plant growth and nutrition *in situ*; therefore, microcosm experiments have been developed to address the relative contribution of roots, soil fungi

and bacteria in the mineral-weathering process. The first demonstrations of a bacterial effect on plant growth were obtained using non-perennial plants and cacti (Toro et al., 1997; Puente et al., 2004a,b, 2009). As an example, Puente et al. (2004b, 2009), demonstrated that rhizosphere and endophytic bacteria, by releasing a significant amount of nutrients from rocks, promoted the growth of cactus seedlings. More recently, the challenge of developing microcosms with trees has been overcome. Using pine seedlings grown in a mixture of biotite and quartz (Fig. 2B), Calvaruso et al. (2006) demonstrated, through a mineral-weathering budget approach, that the inoculation of a selected *B. glathei* strain PML1(12) significantly enhanced the release of magnesium and potassium from biotite 1.4- and 1.5-fold, respectively, compared to non-inoculated plants. In addition, strain PML1(12) significantly improves pine growth and modifies root morphology (increase in the number of lateral roots and root hairs). Notably, this bacterial strain significantly increased plant growth only under nutrient-poor conditions, suggesting that the growth-promoting effect of this strain resulted from improved plant nutrition through increased mineral-weathering.

In soil, microorganisms live in complex associations, and to illustrate these associations, microcosms testing the effect of co-inoculating different bacteria and/or fungi have been developed (Leyval and Berthelin, 1989, 1991; Toro et al., 1997). Koele et al. (2009) tested the effect of co-inoculating mycorrhizal fungi (*Laccaria bicolor* or *Scleroderma citrinum*) and efficient mineral-weathering bacteria (*B. glathei* or *Collimonas* sp.) in *P. sylvestris* microcosms (Fig. 2B). They demonstrated that this co-inoculation significantly increased magnesium plant uptake and plant biomass compared to non-inoculated plants. Notably, they also demonstrated that this effect was strongly dependent on the ability of the bacterial strains to colonize their environment (Koele et al., 2009). Indeed, both bacterial strains were enriched in the mycorrhizosphere environment compared to the surrounding soil. Similarly, Olsson and Wallander (1998) reported that in *P. sylvestris* microcosms, the ectomycorrhizal fungus *Suillus variegatus* can stimulate bacterial growth under some circumstances, such as with biotite addition, while it may inhibit bacterial growth under other circumstances, such as

when minerals are absent. These results suggest that ectomycorrhizal fungi can drive the bacterial communities based upon their nutrient needs. They also highlight the necessity of evaluating both the ability of these bacterial communities to weather minerals and their relative role. All these observations highlight the need for taking into account the ecology of mineral-weathering microorganisms and to demonstrate that the mineral-weathering process in soil is not a simple additive effect of different factors but that other factors, such as microbial interactions, are involved and need to be monitored.

3.4. Relationship between carbon and nitrogen sources and mineral-weathering

Besides oxidoreduction and chelation, the main mechanism used by heterotrophic bacteria to weather minerals is acidification. This acidification is strongly linked to the production of protons and organic acids (Uroz et al., 2009b). Several studies have demonstrated that bacteria can produce different

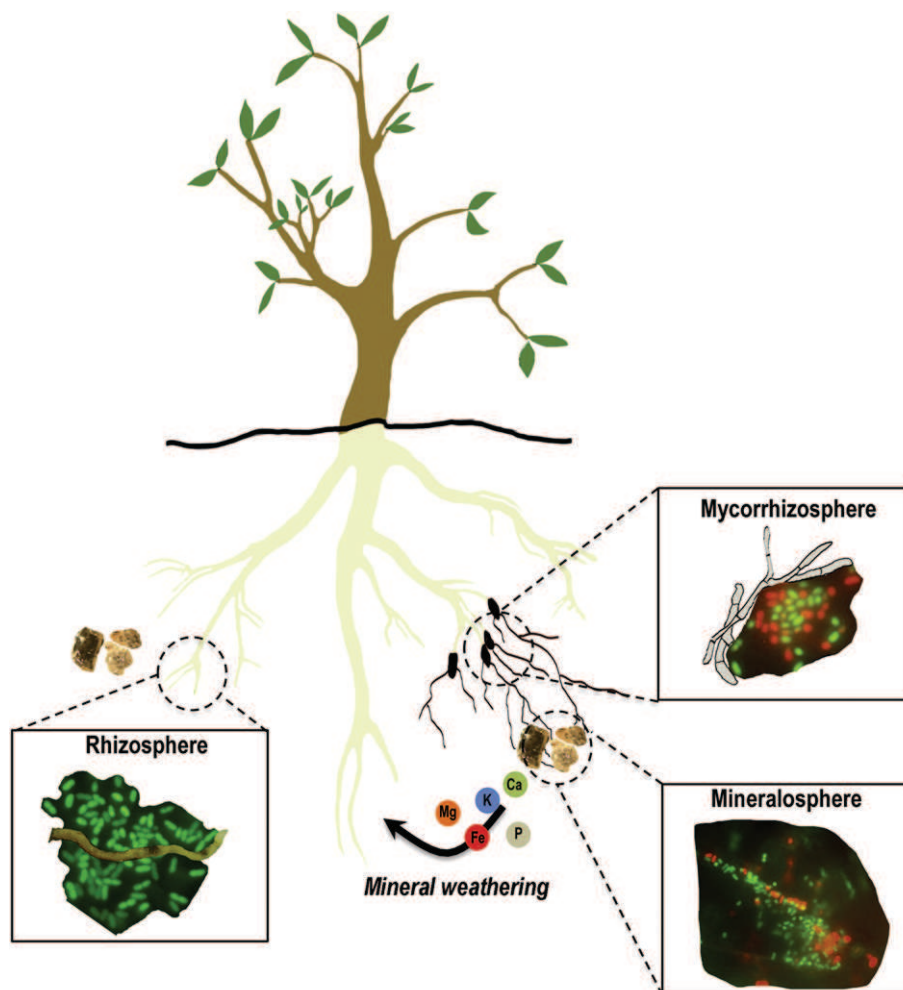


Fig. 4. Highlights of the different environments in which mineral-weathering bacteria in forest soil were detected. The presence of efficient mineral-weathering bacteria was reported in various soil environments such as the rhizosphere (environment around the tree roots), the mycorrhizosphere (environment around mycorrhizal tree roots) and the mineralosphere (environment around mineral particles). By releasing nutritive cations entrapped in the soil minerals, bacteria actively participate in tree nutrition.

metabolites depending on the available nutrient resources and on their own physiology (Nautiyal et al., 2000; Hameeda et al., 2006; Lin et al., 2006; Uroz et al., 2007, 2009a; Balland et al., 2010). Notably, it is now well established that the carbon sources contained in the root or mycorrhizal root exudates of trees or other plants impact the taxonomic and functional structure of the soil bacterial communities (Frey-Klett et al., 2005; Haichar et al., 2008). Uroz et al. (2007) and Calvaruso et al. (2010) reported that among the forest bacterial isolates they sampled, the most efficient were capable of decreasing the initial pH of the medium from 6.5 to 3 in 48 h incubation time (using glucose as sole carbon source) and released significant amounts of iron from biotite compared to a non-inoculated control or inefficient strains.

Depending on the carbon source available, the mineral-weathering ability of bacteria can be strongly modulated or even suppressed, illustrating that functional plasticity exists. Uroz et al. (2007) demonstrated that all efficient mineral-weathering bacterial strains from the mycorrhizosphere lose their mineral-weathering ability in the presence of mannitol as sole carbon source, which is a sugar alcohol frequently present in plants and fungi (Martin et al., 1984). More recently, Uroz et al. (2009b) demonstrated that *Collimonas* strains were capable of weathering minerals using trehalose, a fungal-derived sugar polyol. Notably, one of these *Collimonas* strains originating from a forest soil weathered biotite more efficiently using trehalose as a carbon source compared to glucose. The impact of the carbon source on mineral-weathering ability was also demonstrated for bacteria from ecosystems other than forests, using xylose or lactose (Nautiyal et al., 2000; Hameeda et al., 2006). Apart from carbon substrates, the ability to weather minerals can also be influenced by the nitrogen source. Nautiyal et al. (2000) demonstrated functional heterogeneity between bacteria in the presence of ammonium or nitrate. Altogether, these observations show that the mineral-weathering ability of the soil bacterial communities is strongly dependent on the carbon and nitrogen sources available in their environment.

4. Impact of the ecological niche on the structure of soil mineral-weathering bacterial communities

The presence of bacteria able to weather minerals, or suspected to do so because of their ability to colonize mineral surfaces (Fig. 3), has been reported in the rhizosphere, rhizoplane and mycorrhizosphere of several plants, including mangrove trees (Vasquez et al., 2000), cactus (Puente et al., 2004b), desert plants (Goldstein et al., 1999) and tree species from temperate forests (Uroz et al., 2007; Calvaruso et al., 2010) (Fig. 4).

4.1. Importance of the soil–mycorrhizosphere continuum

Several studies have demonstrated that the distribution and potential efficacy of mineral-weathering bacteria vary in relation to the ecological niche they occupy (Uroz et al., 2007; Calvaruso et al., 2007, 2010). The mineral-weathering ability

of soil bacteria can be influenced by the relationships they establish with tree roots and mycorrhizal fungi. Using a cultivation-dependent approach, Uroz et al. (2007) demonstrated that the bacterial communities from the oak-*Scleroderma citrinum* mycorrhizosphere were characterized by a higher ability to weather minerals, and especially to consume trehalose as sole carbon source, compared to the ones from the surrounding bulk soil. Similarly, the extramatrical hyphae of the oak-*S. citrinum* ectomycorrhiza (hyphosphere) were also characterized by a higher mineral-weathering efficacy than the ones from the surrounding bulk soil (Calvaruso et al., 2010). However, no significant differences were observed between the bacterial isolates from the *S. citrinum* hyphosphere and ectomycorrhizosphere. The same selection of efficient mineral-weathering bacteria in the vicinity of the mycorrhizal fungus *S. citrinum* was also observed four years earlier at the same experimental site (Uroz et al., 2007; Calvaruso et al., 2007) and in another French forest experimental site (Uroz et al., unpublished). Notably, *S. citrinum* was proved to accumulate trehalose in its mycelium (Uroz et al., 2007), as already shown for other mycorrhizal fungi (Martin et al., 1984). Based on this finding, Uroz et al. (2007) hypothesized that the mycorrhizal symbiont could exert a trehalose-mediated selection on the bacterial communities. Similar selection was reported for the fluorescent *Pseudomonas* communities associated with the mycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* that also accumulates trehalose intracellularly (Frey et al., 1997).

Few data concerning the carbohydrate content of forest soils are available, only average values from the bulk soil have been determined. Thus two important questions are what types of carbon substrates are available for the mineral-weathering bacteria in their environment and in what quantities. Concentrations of glucose ranging from milligram to gram per kg of soil were reported in arable and forest soils respectively (Jolivet et al., 2006; Medeiros et al., 2006; Murataa et al., 1999). In contrast, mannitol and trehalose were only detected in concentrations ranging from microgram to milligram per kg of dry matter of mycorrhizal roots or rhizosphere soil (Kleinschmidt et al., 1998; Medeiros et al., 2006). Carbon sources such as these and others are suspected to control the taxonomic and functional distribution of the bacterial communities. Consequently, these carbohydrates and particularly the zones where they are likely to be enriched, such as the rhizosphere and the mycorrhizosphere, are expected to modulate the mineral-weathering ability of soil bacteria. In this sense, the fact that the two mycorrhizal fungi (*L. bicolor* and *S. citrinum*) considered by Frey-Klett et al. (2005) and Uroz et al. (2007) were found to be inefficient at mineral-weathering (Calvaruso et al., 2009; Koele et al., 2009) and associated with a high proportion of efficient mineral-weathering bacteria strongly suggests a functional complementation between the mycorrhizal fungi and their associated bacterial communities. Such complementation based on the active or passive release of different carbohydrates by the fungus is expected to contribute to the tree and fungal growth and thus to favor forest sustainability.

4.2. The mineralosphere

Aside from the rhizosphere and mycorrhizosphere niches, scientists have also begun to analyze the bacterial taxonomic and/or functional diversity on mineral surfaces in the soil environments or on rock surfaces. It might seem surprising to focus on this specific environment; however, as described earlier minerals constitute a reservoir of inorganic nutrients that play an essential role in nutrient cycling in many ecosystems and especially in forests. As a consequence, minerals may be considered as an oasis of life for microorganisms (Borin et al., 2009) and one would suspect that mineral composition could influence bacterial colonization. In this sense, several works (Gleeson et al., 2006; Carson et al., 2007; Hutchens et al., 2010) have demonstrated, using fingerprinting methods, that the colonization of granite by bacterial communities was dependent on the mineral crystals (muscovite, plagioclase, K-feldspar and quartz) present.

In soil, Certini et al. (2004) demonstrated using a metabolic-based approach that specific bacteria, different from those inhabiting the surrounding bulk soil, colonized mineral surfaces. More recently, Moore-Kucera and Dick, 2008 found that the distribution and biomass of the microbial communities shifted relative to the nutrient status of the soil, the microbial biomass decreasing with decreasing concentrations of phosphorus and calcium in the soil. Such an impact of soil minerals on the bacterial diversity was also reported by Uroz et al. (in press) who incubated pure minerals during a 4-year period in a forest soil. These authors highlighted that mineral colonization by soil bacteria was strongly linked to the mineral type and demonstrated a significant positive correlation between the dissolution rate of minerals and the proportion of Beta-proteobacteria detected on their surface. A negative correlation was also observed between the dissolution rate of the minerals and the Shannon index values related to the richness of the bacterial communities (Uroz et al., in press). This reveals a specific bacterial colonization of the mineral surfaces by particular bacterial groups. Based on 16S rRNA sequence analysis, these authors highlighted that some of them showed 100% homology to those of known mineral-weathering strains belonging to the *Burkholderia* and *Collimonas* genera were retrieved, suggesting that soil minerals select bacterial communities having the ability to release inorganic nutrients from their structure. To date, studies have been based solely on the measurement of mineral-weathering potentials for culturable bacteria isolated from mineral surface. Further studies are now required to quantify the real impact of bacteria in the weathering of mineral particles *in situ*. Bennett et al. (1996) were among the first authors to attempt to estimate the impact of bacteria on silicate weathering *in situ*. Using scanning electron microscopy these authors showed that in petroleum-contaminated groundwater the most colonized minerals were the most intensively weathered. Further research will be needed to compare initially the mineral-weathering potentials of mineral associated bacteria to those of bacteria from the surrounding soil or the rhizosphere and then to characterize their physiological characteristics.

5. Impact of environment and forest management on mineral-weathering bacterial communities

Although few studies have reported the impact of forest management on mineral-weathering bacterial communities, we know that the distribution and the efficacy of the mineral-weathering bacterial communities can be influenced by environmental biotic and abiotic parameters. Here we examine the impact of two such parameters: tree species and soil amendment.

5.1. Impact of tree species

It is well established that the species of tree impacts differentially the physico-chemical characteristics of the soil (Augusto et al., 2000; Calvaruso et al., 2009; Ayres et al., 2009) and that they differ quantitatively and qualitatively in their rhizodeposition (Grayston et al., 1996; Liebeke et al., 2009). As an example, Augusto et al. (2000) reported that coniferous species promoted a significantly higher dissolution of soil minerals than broadleaved species did. Concerning rhizodeposition, Liebeke et al. (2009) used GC–MS to reveal differences in the sugar content of soil extracts performed in different forest soils and demonstrated that oak soil contained mannitol and trehalose that was not present in the beech soil. They reported that the soil extracts collected in each tree stand could support bacterial growth. Tree species is one of the main biotic factors that can influence the density (Lejon et al., 2005) as well as the specific and functional diversity of the bacterial communities in forest soils (Calvaruso et al., 2010). Lejon et al. (2005) highlighted differences in bacterial density and community composition between oak and Norway spruce stands, suggesting a relationship between the soil characteristics and the tree species. Investigating the effect of tree species on nitrogen transformations at the same experimental forest site (Colin-Belgrand et al., 2003; Zeller et al., 2007), the authors found that the amount of nitrate produced during mineralization was lower in the Norway spruce stand compared to that measured in oak and beech stands. The presence of large amounts of ammonium in the vicinity of Norway spruce roots, resulting from a strong ammonification, leads this species to mainly consume nitrogen in this form. Balancing this uptake of positive charges, Norway spruce roots exudate large amounts of protons, resulting in a decrease of soil pH in the rhizosphere, as observed by Calvaruso et al. (2009). As minerals are known to be susceptible to acidification, this pH decrease leads to an increase of the nutrient availability in the rhizosphere environment; however, no difference was observed between the pH of the rhizosphere and bulk soil zones under the hardwood species, suggesting that the nutrients required for the nutrition of the trees are released from soil minerals by another process. One hypothesis to explain mineral release in the absence of soil acidification may be that bacterial communities are involved through their mineral-weathering ability. From the differences observed by Calvaruso et al. (2010) between tree species, it is tempting to speculate that the distribution of the mineral-weathering bacterial communities may be different. Notably,

Calvaruso et al. (2010) revealed a contrasting distribution of mineral-weathering bacterial communities between Norway spruce and hardwood species. Considering the mycorrhizosphere niche and the surrounding bulk soil, those authors observed that there were significantly more efficient mineral-weathering bacteria in the vicinity of the tree roots than in the bulk soil, except in the case of Norway spruce. This suggests that this tree species in itself is able to mobilize inorganic nutrients from the soil reserve. These results are in agreement with those of Jackson and Voigt (1971), who were among the first authors to consider the relative impact of tree species on the distribution of mineral-weathering bacterial communities. Comparing red cedar (*Juniperus virginiana* L.) and white pine (*Pinus strobus* L.), these authors highlighted that there were more mineral-weathering bacteria in the red cedar rhizosphere. Based on these findings, we hypothesize that certain forest tree species have at their disposal a very efficient strategy to balance low nutrient availability in soils through the selection of efficient mineral-weathering bacterial communities in their vicinity.

5.2. Impact of soil amendment

Liming is a forest management practice used to amend nutrient-poor soils, to offset cation deficiencies and to restore soil pH. While this procedure is well known for its beneficial effect on the trees, it also modifies the physical and chemical characteristics of soils, especially the availability of inorganic nutrients, and plant uptake (Tyler and Olsson, 2001). Several studies have demonstrated that liming affects plant primary production and soil carbon (Rangel-Castro et al., 2004), increasing short-term biomass production and root exudation whilst decreasing the amount of inorganic nutrients available in the soil compared to non-limed soils (Tyler and Olsson, 2001). In this context, we can question its impact on the soil microbial communities and, in particular, on mineral-weathering bacterial communities. Liming has been shown to increase or modify the size, structure and/or functioning of soil bacterial communities such as those involved in turnover of organic matter (Gray et al., 2003; Metcalfe et al., 2002; Sheppard and Lloyd, 2002), but few data are available concerning the impact of liming on mineral-weathering bacterial communities. Using an assay to quantify the mineral-weathering efficacy of bacterial isolates, Uroz et al. (unpublished) observed that bacterial strains, isolated from beech plots fertilized with calcium 30 years earlier displayed a significantly higher mineral-weathering potential than those isolated from the non-fertilized plot. These data reveal that liming is an important factor which impacts the long-term functional diversity of mineral-weathering bacterial communities.

6. Conclusion and perspectives

The mineral-weathering process is essential for long-lasting functioning of forest ecosystems, especially in regions where forests are non-amended and characterized by nutrient-poor soils. The contribution of soil microbes to mineral-weathering

processes is now well established. Cultivation-dependent approaches have permitted investigation of the taxonomic and functional distribution of mineral-weathering bacterial communities colonizing various relevant ecological environments in forests such as the rhizosphere, the mycorrhizosphere, the mineralosphere and the surrounding bulk soil. It also has enabled isolation of model bacterial strains for future research. To date, various bacterial genera such as *Burkholderia* or *Collimonas* seem to be characterized by their mineral-weathering ability, and thus their specific 16S rRNA gene sequences are relevant biomarkers of the mineral-weathering function in forest soils in the absence of identified functional genes. We still have some way to travel on our journey to fully understand the role of mineral-weathering bacteria, and multidisciplinary studies linking biogeochemistry to ecology and genetics are needed to do it. Several challenges have yet to be overcome and many questions remain unanswered. Three important areas which should be prioritized are: i) identify genes involved in mineral-weathering ability through conventional genetics with model strains or by functional metagenomics; ii) determine the relative contribution of the different factors using FISH or isotopic techniques; and iii) evaluate and predict the impact of forest management practices, such as liming, and global environmental changes on the distribution and dynamics of mineral-weathering bacterial communities. Unraveling all these questions will greatly improve our understanding of mineral-weathering and nutrient cycling in forest ecosystems.

Acknowledgments

S. Uroz and P. Oger were supported by grants from the Programme national Ecosphère Continentale et Côtière (EC2CO; Programme MicrobiEn), Bureau des Ressources génétiques (BRG), Région Lorraine and INRA. C.L. was supported by a fellowship from the Lorraine Region and INRA. C. C. was supported by a fellowship from the Lorraine Region and ONF (Office Nationale des Forêts). All of these are gratefully acknowledged. We thank Drs. Jean Garbaye, Jacques Ranger, Peter Burlinson and Bertrand Van De Moor-tele for helpful discussions.

References

- Arocena, J.M., Glowka, K.R., 2000. Mineral-weathering in ectomycorrhizosphere of subalpine fir (*Abies lasiocarpa* (Hook.) Nutt.) as revealed by soil solution composition. *For. Ecol. Manag.* 133, 61–70.
- Augusto, L., Turpault, M.-P., Ranger, J., 2000. Impact of forest tree species on feldspar weathering rates. *Geoderma* 96, 215–237.
- Ayres, E., Steltzer, H., Berg, S., Wallenstein, M.D., Simmons, B.L., Wall, D.H., 2009. Tree species traits influence soil physical, chemical, and biological properties in high elevation forests. *PLoS One* 4, e5964.
- Balland, C., Poswa, A., Leyval, C., Mustin, C., 2010. Dissolution rates of phyllosilicates as a function of bacterial metabolic diversity. *Geochim. Cosmochim. Acta* 74, 5478–5493.
- Bennett, P.C., Hiebert, F.K., Choi, W.J., 1996. Microbial colonization and weathering of silicates in a petroleum-contaminated groundwater. *Chem. Geol.* 132, 45–53.

- Bini, E., 2010. Archaeal transformation of metals in the environment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73, 1–16.
- Blum, J.D., Klaue, A., Nezat, C.A., Driscoll, C.T., Johnson, C.E., Siccama, T. G., Eagar, C., Fahey, T.J., Likens, G.E., 2002. Mycorrhizal dissolution of apatite as an important calcium source in base-poor forest ecosystems. *Nature* 417, 729–731.
- Borin, S., Ventura, S., Tambone, F., Mapelli, F., Schubotz, F., Brusetti, L., Scaglia, B., D'Acqui, L.P., Solheim, B., Turicchia, S., Marasco, R., Hinrichs, K.U., Baldi, F., Adani, F., Daffonchio, D., 2009. Rock weathering creates oases of life in a High Arctic desert. *Environ. Microbiol.* 12, 293–303.
- Calvaruso, C., Turpault, M.-P., Frey-Klett, P., 2006. Root-associated bacteria contribute to mineral-weathering and to mineral nutrition in trees, a budgeting analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1258–1266.
- Calvaruso, C., Turpault, M.-P., Leclerc, E., Frey-Klett, P., 2007. Impact of ectomycorrhizosphere on the functional diversity of soil bacterial and fungal communities from a forest stand in relation to nutrient mobilization processes. *Microb. Ecol.* 54, 567–577.
- Calvaruso, C., Mareschal, L., Turpault, M.-P., Leclerc, E., 2009. Rapid clay weathering in the rhizosphere of Norway spruce and oak in an acid forest ecosystem. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 73, 331–338.
- Calvaruso, C., Turpault, M.-P., Leclerc, E., Ranger, J., Garbaye, J., Uroz, S., Frey-Klett, P., 2010. Influence of forest trees on the distribution of mineral-weathering-associated bacterial communities of the *Scleroderma citrinum* mycorrhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4780–4787.
- Carson, J.K., Rooney, D., Gleeson, D.B., Clipson, N., 2007. Altering the mineral composition of soil causes a shift in microbial community structure. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61, 414–423.
- Certini, G., Campbell, C.D., Edwards, A.C., 2004. Rock fragments in soil support a different microbial community from the fine earth. *Soil Biol. Biochem.* 36, 1119–1128.
- Cockell, C.S., Olsson, K., Herrera, A., Meunier, A., 2009. Alteration textures in terrestrial volcanic glass and the associated bacterial community. *Geobiology* 7, 50–65.
- Colin-Belgrand, M., Dambrine, E., Bienaimé, S., Nys, C., Turpault, M.-P., 2003. Influence of tree roots on nitrogen mineralization. *Scand. J. Forest Res.* 18, 260–268.
- Courty, P.-E., Buée, M., Diedhiou, A.G., Frey-Klett, P., Le Tacon, F., Rineau, F., Turpault, M.-P., Uroz, S., Garbaye, J., 2010. The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes, new perspectives and emerging concepts. *Soil Biol. Biochem.* 42, 679–698.
- Dancis, A., Klausner, R.D., Hinesbuch, A.G., Barriocanal, J.G., 1990. Genetic evidence that ferric reductase is required for iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10, 2294–2301.
- de Boer, W., Leveau, J.H.J., Kowalchuk, G.A., Klein Gunnewiek, P.J.A., Abeln, E.C.A., Figge, M.J., et al., 2004. *Collimonas fungivorans* gen. nov., sp. nov., a chitinolytic soil bacterium with the ability to grow on living fungal hyphae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 857–864.
- Demba Diallo, M., Willems, A., Vloemans, N., Cousin, S., Vandekerckhove, T.T., de Lajudie, P., Neyra, M., Vyverman, W., Gillis, M., Van der Gucht, K., 2004. Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the N₂-fixing bacterial diversity in soil under *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* and *Balanites aegyptiaca* in the dryland part of Senegal. *Environ. Microbiol.* 6, 400–415.
- Drever, J.I., 2005. *Surface and Ground Water, Weathering, and Soils*. Elsevier, Amsterdam.
- Frey, P., Frey-Klett, P., Garbaye, J., Berge, O., Heulin, T., 1997. Metabolic and genotypic fingerprinting of fluorescent pseudomonads associated with the Douglas fir-*Laccaria bicolor* mycorrhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1852–1860.
- Frey-Klett, P., Chavatte, M., Clause, M.L., Courier, S., Le Roux, C., Raaijmakers, J., et al., 2005. Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytol.* 165, 317–328.
- Gleeson, D.B., Kennedy, N.M., Clipson, N., Melville, K., Gadd, G.M., McDermott, F.P., 2006. Characterization of bacterial community structure on a weathered pegmatitic granite. *Microb. Ecol.* 51, 526–534.
- Goldstein, A.H., Braverman, K., Osorio, N., 1999. Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limited desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) rhizobacterium. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30, 295–300.
- Gorbushina, A.A., Broughton, W.J., 2009. Microbiology of the atmosphere-rock interface, how biological interactions and physical stresses modulate a sophisticated microbial ecosystem. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 431–450.
- Gray, N.D., Hastings, R.C., Sheppard, S.K., Loughnane, P., Lloyd, D., McCarthy, A.J., Head, I.M., 2003. Effects of soil improvement treatments on bacterial community structure and soil processes in an upland grassland soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 46, 11–22.
- Grayston, S.J., Vaughan, D., Jones, D., 1996. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants, the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Appl. Soil Ecol.* 5, 29–56.
- Gregory, P.J., Hinsinger, P., 1999. New approaches to studying chemical and physical changes in the rhizosphere, an overview. *Plant Soil* 211, 1–9.
- Höppener-Ogawa, S., Leveau, J.H.J., Smart, W., van Veen, J.A., de Boer, W., 2007. Specific detection and real time PCR quantification of potentially mycophagous bacteria belonging to the genus *Collimonas* in different soil ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4191–4197.
- Haichar, F.Z., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J.I., Prosser, J.I., Balesdent, J., Heulin, T., Achouak, W., 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *ISME J.* 2, 1221–1230.
- Hameeda, B., Reddy, Y.H., Rupela, O.P., Kumar, G.N., Reddy, G., 2006. Effect of carbon substrates on rock phosphate solubilization by bacteria from composts and macrofauna. *Curr. Microbiol.* 53, 298–302.
- Herrera, A., Cockell, C.S., Self, S., Blaxter, M., Reitner, J., Arp, G., Dröse, W., Thorsteinnsson, T., Tindle, A.G., 2008. Bacterial colonization and weathering of terrestrial obsidian in Iceland. *Geomicrobiol. J.* 25, 25–37.
- Herrera, A., Cockell, C.S., Self, S., Blaxter, M., Reitner, J., Thorsteinnsson, T., Arp, G., Drose, W., Tindle, A., 2009. A cryptoendolithic community in volcanic glass. *Astrobiol.* 9, 369–381.
- Hinsinger, P., Jaillard, B., 1993. Root-induced release of interlayer potassium and vermiculization of phlogopite as related to potassium depletion in the rhizosphere of ryegrass. *J. Soil Sci.* 44, 525–534.
- Hutchens, E., 2009. Microbial selectivity on mineral surfaces, possible implications for weathering processes. *Fungal Biol. Rev.* doi:10.1016/j.fbr.2009.10.002.
- Hutchens, E., Gleeson, D., McDermott, F., Miranda-CasolLuengo, R., Clipson, N., 2010. Meter-scale diversity of microbial communities on a weathered pegmatite granite outcrop in the Wicklow mountains, Ireland, evidence for mineral induced selection? *Geomicrobiol. J.* 27, 1–14.
- Jackson, T.A., Voigt, G.K., 1971. Biochemical weathering of calcium-bearing minerals by rhizosphere micro-organisms and its influence on calcium accumulation in trees. *Plant Soil* 35, 655–658.
- Jolivet, C., Angers, D.A., Chantigny, M.H., Andreux, F., Arrouays, D., 2006. Carbohydrate dynamics in particle-size fractions of sandy spodosols following forest conversion to maize cropping. *Soil Biol. Biochem.* 38, 2834–2842.
- Kelly, L., Cockell, C.S., Piceno, Y.M., Anderson, G., Thorsteinnsson, T., Marteinnsson, V., 2010. Bacterial diversity of weathered terrestrial Icelandic volcanic glasses. *Microbiol. Ecol.*, in press.
- Kim, Y.H., Bae, B., Chung, Y.K., 2005. Optimization of biological phosphorus removal from contaminated sediments with phosphate-solubilizing microorganisms. *J. Biosci. Bioeng.* 99, 23–29.
- Kleinschmidt, R., Hentschke, I., Rothe, M., 1998. Effect of season and soil treatments on carbohydrate concentrations in Norway spruce (*Picea abies*) mycorrhizae. *Tree Physiol.* 18, 325–332.
- Koele, N., Turpault, M.-P., Hildebrand, E.E., Uroz, S., Frey-Klett, P., 2009. Interactions between mycorrhizal fungi and mycorrhizosphere bacteria during mineral-weathering, budget analysis and bacterial quantification. *Soil Biol. Biochem.* 41, 1935–1942.
- Landeweert, R., Hoffland, E., Finlay, R.D., Kuyper, T.W., van Breemen, N., 2001. Linking plants to rock, ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends Ecol. Evol.* 16, 248–253.

- Lejon, D.P.H., Chaussod, R., Ranger, J., Ranjard, L., 2005. Microbial community structure and density under different tree species in an acid forest soil (Morvan, France). *Microb. Ecol.* 50, 614–625.
- Leveau, J.H.J., Uroz, S., de Boer, W., 2009. The bacterial genus *Collimonas*, mycophagy, weathering and other adaptive solutions to life in oligotrophic soil environments. *Environ. Microbiol.* doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02010.x.
- Leyval, C., Berthelin, J., 1989. Interactions between *Laccaria laccata*, *Agrobacterium radiobacter* and beech roots, influence on P, K, Mg, and Fe mobilization from minerals and plant growth. *Plant Soil* 117, 103–110.
- Leyval, C., Berthelin, J., 1991. Weathering of a mica by roots and rhizospheric micro-organisms of pine. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 55, 1009–1016.
- Liebeke, M., Brözel, V.S., Hecker, M., Lalk, M., 2009. Chemical characterization of soil extract as growth media for the ecophysiological study of bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83, 161–173.
- Lin, T.F., Huang, H.I., Shen, F.T., Young, C.C., 2006. The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174. *Bioresour. Technol.* 97, 957–960.
- Männistö, M.K., Häggblom, M.M., 2006. Characterization of psychrotolerant heterotrophic bacteria from Finnish Lapland. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 229–243.
- Martin, F., Canet, D., Marchal, J.P., 1984. In vitro abundance ¹³C NMR studies of the carbohydrate storage in ectomycorrhizal fungi. *Physiol. Vég.* 22, 733–743.
- Medeiros, P.M., Fernandes, M.F., Dick, R.P., Simoneit, B.R.T., 2006. Seasonal variations in sugar contents and microbial community in a rye grass soil. *Chemosphere* 65, 832–839.
- Metcalfe, A.C., Krsek, M., Gooday, G.W., Prosser, J.I., Wellington, E.M.H., 2002. Molecular analysis of a bacterial chitinolytic community in an upland pasture. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5042–5050.
- Moore-Kucera, J., Dick, R.P., 2008. PLFA profiling of microbial community structure and seasonal shifts in soils of a Douglas-fir chronosequence. *Microb. Ecol.* 55, 500–511.
- Murataa, T., Tanakaa, H., Yasuea, H., Hamadab, R., Sakagamia, K., Kurokawaa, Y., 1999. Seasonal variations in soil microbial biomass content and soil neutral sugar composition in grassland in the Japanese temperate zone. *Appl. Soil Ecol.* 11, 253–259.
- Nambiar, E.K.S., 1997. Sustained productivity of forest is a continuing challenge to soil science. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 60, 1629–1642.
- Nautiyal, C.S., Bhadauria, S., Kumar, P., Lal, H., Mondal, R., Verma, D., 2000. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiol. Lett.* 182, 291–296.
- Offre, P., Pivato, B., Siblot, S., Gamalero, E., Corberand, T., Lemanceau, P., Mougel, C., 2007. Identification of bacterial groups preferentially associated with mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 913–921.
- Olsson, P.A., Wallander, H., 1998. Interactions between ectomycorrhizal fungi and the bacterial community in soils amended with various primary minerals. *FEMS Microbiol. Ecol.* 27, 195–205.
- Olsson-Francis, K., de la Torre, R., Cockell, C.S., 2010. Isolation of novel extreme-tolerant cyanobacteria from a coastal rock-dwelling microbial community using exposure to low Earth orbit. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2115–2121.
- Paris, F., Botton, B., Lapeyrie, F., 1996. In vitro weathering of phlogopite by ectomycorrhizal fungi .2. Effect of K⁺ and Mg²⁺ deficiency and N sources on accumulation of oxalate and H⁺. *Plant Soil* 179, 141–150.
- Puente, M.E., Li, C.Y., Bashan, Y., 2004a. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. II. Growth promotion of cactus seedlings. *Plant Biol.* 6, 643–650.
- Puente, M.E., Bashan, Y., Li, C.Y., Lebsky, V.K., 2004b. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biol.* 6, 629–642.
- Puente, M.E., Li, C.Y., Bashan, Y., 2009. Endophytic bacteria in cacti seeds can improve the development of cactus seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 66, 402–408.
- Rangel-Castro, J.I., Prosser, J.I., Scrimgeour, C.M., Smith, P., Ostle, N., Ineson, P., Meharg, A., Kilham, K., 2004. Carbon flow in an upland grassland, effect of liming on the flux of recently photosynthesized carbon to rhizosphere soil. *Global Change Biol.* 10, 2100–2108.
- Ranger, J., Turpault, M.P., 1999. Input–output nutrient budgets as a diagnostic tool for sustainable forest management. *For. Ecol. Manag.* 122, 139–154.
- Séguin, V., Courchesne, F., Gagnon, C., Martin, R.R., Naftel, S.J., Skinner, W., 2005. Mineral-weathering in the rhizosphere of forested soils. Chap. 2. In: Huang, P.M., Gobran, G.R. (Eds.), *Biogeochemistry of Trace Elements in the Rhizosphere*, pp. 29–55.
- Santelli, C.M., Edgcomb, V.P., Bach, W., Edwards, K.J., 2008. The diversity and abundance of bacteria inhabiting seafloor lavas positively correlate with rock alteration. *Environ. Microbiol.* 11, 86–98.
- Sheppard, K., Lloyd, D., 2002. Effects of soil amendment on gas depth profiles in soil monoliths using direct mass spectrometric measurement. *Bioresour. Technol.* 84, 39–47.
- Thorseth, I.H., Furnes, H., Heldal, M., 1992. The importance of microbiological activity in the alteration of natural basaltic glass. *Geochim. Cosmochim. Acta* 56, 845–850.
- Toro, M., Azcon, R., Barea, J., 1997. Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (³²P) and nutrient cycling. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4408–4412.
- Turpault, M.-P., Nys, C., Calvaruso, C., 2009. Rhizosphere impact on the dissolution of test minerals in a forest ecosystem. *Geoderma* 153, 147–154.
- Tyler, G., Olsson, T., 2001. Plant uptake of major and minor mineral elements as influenced by soil acidity and liming. *Plant Soil* 230, 307–321.
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.-P., Pierrat, J.-C., Mustin, C., Frey-Klett, P., 2007. Effect of the mycorrhizosphere on the genotypic and metabolic diversity of the soil bacterial communities involved in mineral-weathering in a forest soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3019–3027.
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.-P., Frey-Klett, P., 2009a. The microbial weathering of soil minerals, ecology, actors and mechanisms. *Trends Microbiol.* 17, 378–387.
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.-P., Sarniguet, A., de Boer, W., Leveau, J.H.J., Frey-Klett, P., 2009b. Efficient mineral-weathering is a distinctive functional trait of the bacterial genus *Collimonas*. *Soil Biol. Biochem.* 41, 2178–2186.
- Uroz, S., Buée, M., Murat, C., Frey-Klett, P., Martin, F., 2010. Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil. *Environ. Microb. Rep.* 2, 281–288.
- Uroz, S., Turpault, M.P., Delaruelle, C., Mareschal, L., Pierrat, J.-C., Frey-Klett, P. Minerals affect the specific diversity of forest soil bacterial communities. *Geomicrobiol. J.*, in press.
- Vasquez, P., Holguin, G., Puente, M.E., Lopez-Cortez, A., Bashan, Y., 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol. Fertil. Soils* 30, 460–468.
- Vial, L., Groleau, M.-C., Dekimpe, V., Déziel, E., 2007. *Burkholderia* diversity and versatility, an inventory of the extracellular products. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 1407–1429.
- Wallander, H., 2000. Uptake of P from apatite by *Pinus sylvestris* seedlings colonised by different ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil* 218, 249–256.
- White, A.F., Brantley, S.L., 1995. Chemical weathering rates of silicate minerals, an overview. In: White, A.F., Brantley, S.L. (Eds.), *Chemical Weathering Rates of Silicate Minerals*. Mineralogical Society of America, Washington, pp. 1–22.
- Wu, L., Jacobson, A.D., Chen, H.S., Hausner, M., 2007. Characterization of elemental release during microbe–basalt interactions at T = 28 °C. *Geochim. Cosmochim. Acta* 71, 2224–2239.
- Wu, L., Jacobson, A.D., Hausner, M., 2008. Characterization of elemental release during microbe–granite interactions at T = 28 °C. *Geochim. Cosmochim. Acta* 72, 1076–1095.
- Zeller, B., Recous, S., Kunze, M., Moukoui, J., Colin-Belgrand, M., Bienaimé, S., Ranger, J., Dambrine, E., 2007. Influence of tree species on gross and net N transformation in forest soils. *Ann. For. Sci.* 64, 151–158.

Glossary

Acidic forest: forest with a soil characterized by low pH (<4.5) and poorly weatherable minerals.

Acidolysis: mineral dissolution owing to acidification of the medium.

Apatite: a calcium phosphate mineral.

Biotite: a mica-type mineral containing potassium, iron and magnesium.

Complexolysis: mineral dissolution owing to chelation of ions.

Mineral-weathering: dissolution and transformation of a mineral.

Mineral-weathering budget approach: sum of output by drainage and nutrient uptake into seedlings during the experiment (in the absence of atmospheric deposits).

Mycorrhizal fungi: fungi growing in symbiosis with a plant, forming mycorrhizae.

Mycorrhizosphere: volume of soil under the influence of mycorrhizae.

Phyllosilicate: a type of mineral containing SiO₄ tetrahedral crystals.

Rhizosphere: the volume of soil under the root influence.

Jusqu'à présent, **seules les communautés bactériennes de la rhizosphère et de la mycorrhizosphère ont été étudiées pour leur capacité à altérer les minéraux**. Dans le cadre de cette thèse, **une autre niche écologique potentielle pour ces communautés bactériennes a été étudiée : les minéraux**. Cet intérêt est basé sur l'hypothèse qu'au même titre que le voisinage de la racine, le minéral peut soutenir la croissance de communautés microbiennes adaptées. A ce jour, la racine a été considérée comme l'habitat des microorganismes et le minéral comme la source de nutriments inorganiques. Ne peut-on à l'inverse considérer le minéral comme un habitat, relativement pauvre en nutriments organiques, et son voisinage (racine, matière organique) comme une source de nutriments ?

4. Les minéraux : une niche écologique potentielle pour les communautés bactériennes

4.1. Définition

De façon générale, un minéral est un solide constitué d'une structure cristalline définie selon un schéma régulier et périodique qui dessine un réseau structural tridimensionnel (Aubouin *et al.*, 1975). Une roche quand à elle est définie par un agrégat de différentes espèces minérales (Aubouin *et al.*, 1975). Parmi les minéraux constituant un sol, on distingue deux « types » de minéraux : les minéraux primaires et les minéraux secondaires. Les minéraux primaires sont des minéraux n'ayant pas subi d'altération postérieure à leur dépôt (ex : biotite, apatite). Les minéraux primaires sont hérités de la roche mère. Les minéraux secondaires sont des minéraux (i) précipités dans le sol (mécanismes de néoformation) comme les oxydes et hydroxydes ou encore la kaolinite ou (ii) issus de la transformation de phyllosilicates comme par exemple la vermiculite qui est issue de la transformation du mica (Aubouin *et al.*, 1975).

4.2. Les minéraux comme habitat pour les communautés bactériennes

Les roches et les minéraux semblent être colonisés par des cyanobactéries, des champignons, des archéobactéries et des bactéries depuis des milliers d'années à en croire l'analyse de roches fossilisées (Westall *et al.*, 2001 ; Furnes, 2004). De nos jours, de telles communautés de microorganismes ont pu être observées sur des roches volcaniques (Kelly *et al.*, 2011), océaniques (Santelli *et al.*, 2008), du désert arctique (Borin *et al.*, 2009), des déserts de sable (de los Rios *et al.*, 2010 ; Chanal *et al.*, 2006), des glaciers (Frey *et al.*, 2010), des monuments historiques tels les temples Mayas (Garcia de Miguel, 1995 ; Ortega-morales, 2000) et même sur les minéraux (apatite) que sont nos dents (Selwitz *et al.*,

Tableau 1.1 : Liste non exhaustive des études ayant caractérisés des bactéries à la surface des minéraux.

Environnement	Minéral ¹ / Roche	Communautés bactériennes (phylum) ²	Méthodes utilisées	Test fonctionnels	Référence
Patrimoine artistique et architectural					
Peinture murale (Espagne)	Grès (quartz, feldspath, mica, tourmaline, glauconite, illite, kaolinite)	<i>Firmicutes, Actinobacteria</i>	Analyse des méthyles esters d'acides gras (FAME)	Altération de l'hématite par des <i>Bacillus</i> isolés du grès	Gonzalez et al., 1999
Peinture murale, Nécropole de Carmona (Espagne)	Roches d'une tombe	<i>Firmicutes, Actinobacteria, α-proteobacteria</i>	Clonage / séquençage du gène 16S		Heyrman et Swings, 2001
Murs de cathédrales (Italie, Espagne, Portugal)	Grès (Italie)	<i>Bacteroidetes</i>	DGGE et séquençage du gène 16S		Miller et al., 2009
Monument (Chine)	Brique	<i>Actinobacteria, TM7, Bacteroidetes, γ-proteobacteria, δ-proteobacteria, Firmicutes, Chloroflexi, Deinococcus-Thermus, Uncultured bacteria</i>	DGGE (électrophorèse sur gel en gradient dénaturant)	Dissolution de la brique poudre par les bactéries isolées	Wang et al., 2011
Cité d'Angkor (Cambodge)	Grès	<i>Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria</i>	Microscopie, clonage / séquençage du gène 16S et DGGE		Gaylarde et al., 2012
	Grès (Espagne) Grès (Portugal)	<i>Actinobacteria, Bacteroidetes Acidobacteria, Bacteroidetes</i>			
Milieus miniers et grottes					
Grotte (Espagne)	Roche au niveau d'une peinture murale	<i>Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Nitrospirae, WS3</i>	Clonage / séquençage du gène 16S et DGGE		Schabereiter-Gurtner et al., 2004
Mine d'or (Pologne)	Roches de la paroi	Bactéries résistantes à l'arsenic : <i>γ-proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes</i>	Approche cultivable et séquençage du gène 16S	Test pour la production de sidérophores et pour la présence du gène <i>arsC</i>	Drewniak et al., 2008
Grotte (Slovénie)	Récupération de colonies bactériennes directement sur les parois de la grotte	<i>γ-proteobacteria, Actinobacteria, Nitrospirae, β-proteobacteria, Acidobacteria, α-proteobacteria, Chloroflexi, Gemmatimonadetes, δ-proteobacteria, Verrucomicrobia, Planctomycetes</i>	Clonage / séquençage du gène 16S		Pasic, et al., 2009
Mine de Bore (Australie)	Sphalérite, pyrite, chalcopryrite, galène	<i>Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Acidobacteria, Chloroflexi</i>	DGGE et puce PhyloChip 16S	Tests métaboliques BIOLOG® Ecoplate	Wakelin et al., 2011

Tableau 1.1 (suite)

Milieux désertiques et montagneux					
Désert de Tataouine (Tunisie)	Météorite	Pas de caractérisation taxonomique, Observation de bactéries à la surface de la météorite	Microscopie électronique à transmission et à balayage		Gillet et al., 2000
Désert Polaire (Canada)	Calcite, grès (quartz), granite (quartz, feldspath, biotite)	Pas de caractérisation taxonomique, observation de bactéries à la surface des minéraux	Observation par microscopie électronique à balayage		De los Rios et al., 2004
Montagne Whipple (Californie, USA)	Roches « vernies »	<i>Actinobacteria</i>	Approche cultivable, analyse PLFA (phospholipid low fatty acid) et clonage / séquençage du gène 16S	Tests des bactéries isolées pour leur résistance aux UV	Kuhlman et al., 2005
Désert du Sahara (Maroc et Tunisie)	Grains de sable	Pas de caractérisation taxonomique mais présence de bactériophage	Approche cultivable et observation au microscope électronique		Pringent et al., 2005
Désert de Tataouine (Tunisie)	Grains de sable	<i>Proteobacteria</i> (α -, γ -, δ -, ε -), <i>Actinobacteria</i> , <i>Chloroflexi</i> , <i>Deinococcus-Thermus</i> , <i>Planctomycetes</i> , <i>Verrucomicrobia</i> , <i>Firmicutes</i>	Approche cultivable et séquençage du gène 16S	Test des bactéries isolées pour leur tolérance aux radiations ionisantes	Chanal et al., 2006
Glacier (Désert Arctique, Svalbard)	Moraine (pyrite, apatite, gypse, jarosite, kaolinite, quartz)	(uniquement pour la zone oxydée de la moraine) <i>Acidobacteria</i> , α - <i>proteobacteria</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Unclassified bacteria</i> , γ - <i>proteobacteria</i> , β - <i>proteobacteria</i> , <i>Planctomycetes</i>	ARISA		Borin et al., 2009
Affleurement (désert Arctique du Canada)	Evaporite	<i>Actinobacteria</i>	Clonage / séquençage du gène 16S	Néoformation de gypse	Cockell et al., 2010b
Désert Atacama (Chili)	Halite	<i>Bacteroidetes</i> , <i>Actinobacteria</i>	DGGE		De los Rios, 2010
Falaise (Angleterre)	Schiste oxydé (quartz, feldspath, muscovite, illite, chlorite, pyrite, gypse)	α - <i>proteobacteria</i> , γ - <i>proteobacteria</i> , <i>Acidobacteria</i> , <i>Nitrospirae</i> , δ - <i>proteobacteria</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Chloroflexi</i> , β - <i>proteobacteria</i>	Clonage / séquençage du gène 16S et DGGE		Cockell et al., 2010
Glacier (Suisse)	Granite (albite, quartz, microcline, muscovite, biotite, épidote, chlorite, magnétite)	β - <i>proteobacteria</i> , <i>Actinobacteria</i> , α - <i>proteobacteria</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Bacteroidetes</i> , γ - <i>proteobacteria</i>	Clonage / séquençage du gène 16S	Altération du granite en poudre (<i>Janthinobacterium</i> , <i>Polaromonas</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Leifsonia</i>) / consommation de glucose / production d'acide oxalique	Frey et al., 2010
Glacier (Suisse)	Granite (albite, quartz, microcline, muscovite, biotite, épidote, chlorite, magnétite)	α - <i>proteobacteria</i> , β - <i>proteobacteria</i> , γ - <i>proteobacteria</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Firmicutes</i>	Clonage / séquençage du gène 16S	Dissolution du granite en poudre par des bactéries isolées du granite (<i>Pseudomonas</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Janthinobacterium</i> , <i>Collimonas</i>)	Lapanje et al., 2010
Montagne de Granite Mormone (Utah, USA)	Granite	<i>Actinobacteria</i> , α - <i>proteobacteria</i> , γ - <i>proteobacteria</i> , <i>Firmicutes</i>	DGGE		Kan et al., 2011
Milieux volcaniques					
Affleurement de montagne (Irlande)	Veine de pegmatite d'un granite, extraction de cristaux de muscovite, plagioclase, feldspath et de quartz	Pas de caractérisation taxonomique mais chaque minéral présente une structure bactérienne différentes (ribotype)	ARISA		Gleeson et al., 2006
Affleurement volcanique (Islande)	Obsidienne (rhyolite)	<i>Actinobacteria</i> , <i>Acidobacteria</i> , <i>Verrucomicrobia</i> , α - <i>proteobacteria</i>	Clonage / séquençage du gène 16S	Colonisation <i>in vitro</i> d'un fragment d'obsidienne stérilisé en surface et altération de ce fragment	Herrera et al., 2008
Volcan (Islande)	Basalte, obsidienne, palagonite	<i>Actinobacteria</i> , α - <i>proteobacteria</i> , <i>Acidobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> , β - <i>proteobacteria</i> , <i>Gemmatimonadetes</i> , <i>Verrucomicrobia</i> , <i>Unclassified bacteria</i> , γ - <i>proteobacteria</i>	Clonage / séquençage du gène 16S		Cockell et al., 2009
Volcan (Islande)	Basalte / Palagonite	<i>Actinobacteria</i> , <i>Acidobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> , α - <i>proteobacteria</i> , <i>Planctomycetes</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Gemmatimonadetes</i> , β - <i>proteobacteria</i> , <i>Chloroflexi</i> , <i>OP10</i> , δ - <i>proteobacteria</i> , ε - <i>proteobacteria</i> , <i>Verrucomicrobia</i>	Clonage / séquençage du gène 16S, DGGE et PhyloChip		Kelly et al., 2010
	Obsidienne	<i>Actinobacteria</i> , α - <i>proteobacteria</i> , <i>Acidobacteria</i> , <i>Firmicutes</i> , β - <i>proteobacteria</i> , δ - <i>proteobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Chloroflexi</i> , <i>OP10</i> , <i>Planctomycetes</i> , <i>dictyglomi</i> , <i>Thermodesulfobacteria</i>			
	Basalte (andésite et rhyolithe)	<i>Acidobacteria</i> , <i>Verrucomicrobia</i> , γ - <i>proteobacteria</i> , <i>Firmicutes</i> , α - <i>proteobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Actinobacteria</i> , β - <i>proteobacteria</i> , <i>Chloroflexi</i> , δ - <i>proteobacteria</i> , <i>TM7</i> , <i>Gemmatimonadetes</i> , <i>Planctomycetes</i> , <i>OP10</i> , <i>Deinococcus-Thermus</i> , <i>Aquificae</i> , <i>Lentisphaerae</i> , <i>Thermodesulfobacteria</i> , <i>Dictyoglomi</i> , <i>Deferribacteres</i>			
Affleurement volcanique (Irlande)	Veine de pegmatite : Feldspath	α - <i>proteobacteria</i> , γ - <i>proteobacteria</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Firmicutes</i> , β - <i>proteobacteria</i>	ARISA		Hutchens et al., 2010
	Muscovite	α - <i>proteobacteria</i> , γ - <i>proteobacteria</i>			
	Quartz	α - <i>proteobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> , γ - <i>proteobacteria</i> , β - <i>proteobacteria</i>			

2007) (Tableau 1.1). A la vue de ces résultats, plusieurs questions se posent : **Pourquoi les microorganismes, et, dans le cas qui nous intéresse, les bactéries colonisent-elles les minéraux ? Quels sont les facteurs structurants de cette colonisation ? Sont-ils les mêmes pour les roches à l'air libre et les roches enfouies dans le sol ou sous l'océan ?**

Une partie de la réponse réside probablement dans le fait que **les minéraux, de part les cations nutritifs constituant leur structure cristalline, peuvent être assimilés à une source de nutriments**. Il s'avère en effet que la composition minéralogique des minéraux soit un facteur sélectif des communautés microbiennes. Une première étude menée sur un affleurement de granite par Gleeson *et al.* (2006) a démontré un contrôle significatif de la composition minéralogique sur la colonisation en conditions *in situ*. En combinant une approche par ARISA (automated ribosomal intergenic spacer analysis) avec une analyse d'empreinte bactérienne, ces auteurs ont démontré que les communautés bactériennes étaient taxonomiquement différentes selon les inclusions minérales observées sur le granite (quartz, muscovite, plagioclase, feldspath potassique ou le granite). Les différents groupes bactériens observés dans cette étude étaient corrélés avec la composition minéralogique de ces inclusions (Si, Al, K et/ou Fe), suggérant une communauté bactérienne spécifique à chaque minéral (Gleeson *et al.*, 2006). Ce résultat tend à penser que les communautés bactériennes coloniseraient les minéraux en fonction des cations nutritifs qu'ils renferment. Cette étude est en adéquation avec celle de Hutchens *et al.* (2010) qui, par la combinaison d'une analyse ARISA avec une approche cultivable, ont analysé des minéraux extraits d'une veine de pegmatite située au niveau d'un affleurement de montagne. Les différents minéraux extraits (muscovite, feldspath potassique et quartz) étaient colonisés différemment par les bactéries en fonction de leur composition minéralogique, renforçant ainsi les précédentes conclusions. Un autre exemple est celui des grottes de Carlsbad. L'étude de deux sites de ces grottes se différenciant par la composition de leurs roches a mis en évidence des communautés bactériennes significativement différentes d'un point de vue taxonomique. Le premier site, caractérisé par des roches riches en carbonate de calcium, présentait une diversité bactérienne très pauvre et peu abondante. Le deuxième site, caractérisé par des oxydes et hydroxydes de fer (hématite, magnétite) ainsi que d'autres minéraux secondaires (tourmaline, zircon, rutile, apatite et épidote), présentait une diversité bactérienne plus élevée (Barton *et al.*, 2007). A nouveau, cet exemple suggère que c'est le contenu nutritif des minéraux, plus riche et varié sur le deuxième site, qui influence la colonisation bactérienne. Enfin, *via* une étude anaérobie en microcosme et en système fermé, mimant une nappe phréatique, Roberts (2004) a démontré que les minéraux n'étaient pas seulement colonisés en fonction de leur contenu nutritif, mais également en fonction de leur toxicité. Cette étude a révélé que tous les minéraux contenant plus de 1,2% de Al_2O_3 n'étaient pas colonisés, renforçant les résultats de Illmer et

Tableau 1.2 : Formules chimiques des espèces minérales citées dans le tableau.

Classe de minéraux	Famille de minéraux	Groupe	Espèce minérale	Formule chimique		
Silicate	Tectosilicate		Quartz	SiO_2		
		Plagioclase	Albite	$\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$		
			Plagioclase	$\text{Na}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Si}_3\text{AlO}_8$		
	Phyllosilicate	Feldspath	Microcline	KAlSi_3O_8		
			Kaolinite	$\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$		
		Mica	Glauconite	$(\text{K}, \text{Na})_2(\text{Fe}^{3+}, \text{Fe}^{2+}, \text{Al}, \text{Mg})_4[\text{Si}_6(\text{Si}, \text{Al})_2\text{O}_{20}](\text{OH})_4$		
			Illite	$\text{K}(\text{Al}, \text{Mg}, \text{Fe})_2(\text{Si}, \text{Al})_4\text{O}_{10}[(\text{OH})_2, (\text{H}_2\text{O})]$		
			Muscovite	$\text{KAl}_2[(\text{OH}, \text{F})_2\text{AlSi}_3\text{O}_{10}]$		
			Biotite	$\text{K}(\text{Mg}, \text{Fe})_3(\text{OH}, \text{F})_2(\text{Si}_3\text{AlO}_{10})$		
			Phlogopite	$\text{KMg}_3\text{AlSi}_3\text{O}_{10}\text{F}(\text{OH})$		
			Chlorite	$(\text{Mg}, \text{Fe}, \text{Mn}, \text{Al})_{12}((\text{Si}, \text{Al})_8\text{O}_{20})(\text{OH})_{16}$		
			Epidote	$\text{Ca}_2(\text{Fe}, \text{Al})\text{Al}_2(\text{SiO}_4)(\text{Si}_2\text{O}_7)\text{O}(\text{OH})$		
			Sorosilicate			
Oxyde et hydroxyde			Magnétite	$\text{Fe}^{+2}\text{Fe}^{+3}\text{O}_4$		
			Ferrihydrite	$(\text{Fe}^{3+})_2\text{O}_3 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$		
			Hématite	Fe_2O_3		
Halogénure Sulfure			Halite	NaCl		
			Pyrite	FeS_2		
			Chalcopyrite	CuFeS_2		
			Galène	PbS		
			Sphalérite	$(\text{Zn}, \text{Fe})\text{S}$		
Carbonate			Calcite	CaCO_3		
Phosphate			Apatite	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH}, \text{Cl}, \text{F})$		
Sulfate			Gypse	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		
			Jarosite	$\text{K}^+\text{Fe}^{3+}_3(\text{OH})_6(\text{SO}_4^{2-})_2$		
Roche	Rhyolithe		Obsidienne	SiO_2 , plus MgO , Fe_3O_4		

Tableau 1.1 (Suite)

Milieux aquatiques					
Faille océanique (Pacifique Nord)	Basalte (20 ans)	<i>γ-proteobacteria</i> , <i>α-proteobacteria</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Bacteroidetes</i>	DGGE		Lysnes et al., 2004
	Basalte (0,1 Ma)	<i>γ-proteobacteria</i> , <i>Chloroflexi</i> , <i>α-proteobacteria</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>ε-proteobacteria</i> , <i>δ-proteobacteria</i> , Autres bactéries			
	Basalte (1 Ma)	<i>Actinobacteria</i> , <i>γ-proteobacteria</i> , <i>Firmicutes</i>			
Aquifère (Tennessee, USA)	Hématite	<i>γ-proteobacteria</i> , <i>α-proteobacteria</i> , <i>β-proteobacteria</i> , <i>δ-proteobacteria</i> , <i>Actinobacteria</i>	Utilisation d'un « tube » en maille contenant les minéraux / Clonage en T-RFLP gène 16S et séquençage		Boyd et al., 2007
	Quartz	<i>α-proteobacteria</i> , <i>γ-proteobacteria</i> , <i>β-proteobacteria</i>			
	Saprolite	<i>β-proteobacteria</i> , <i>α-proteobacteria</i> , <i>γ-proteobacteria</i> , <i>Actinobacteria</i>			
	Verre	<i>γ-proteobacteria</i> , <i>β-proteobacteria</i> , <i>α-proteobacteria</i> , <i>Actinobacteria</i>			
Plancher Océanique (Faille Pacifique Est)	Basalte : Non altéré	<i>γ-proteobacteria</i> , <i>ε-proteobacteria</i> , <i>β-proteobacteria</i> , <i>α-proteobacteria</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>δ-proteobacteria</i> , <i>Unclassified bacteria</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Acidobacteria</i> , <i>Spirochaetes</i> , <i>Planctomycetes</i>	Clonage / séquençage du gène 16S		Santelli et al., 2008
	Avec cristaux AIO	<i>α-proteobacteria</i> , <i>γ-proteobacteria</i> , <i>Planctomycetes</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Unclassified bacteria</i> , <i>Acidobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>δ-proteobacteria</i> , <i>Chlamydiae</i>			
	Avec cristaux FeO ₂	<i>γ-proteobacteria</i> , <i>α-proteobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Planctomycetes</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Verrucomicrobia</i> , <i>Unclassified bacteria</i> , <i>δ-proteobacteria</i> , <i>Nitrospirae</i>			
	Avec cristaux FeO ₁	<i>γ-proteobacteria</i> , <i>α-proteobacteria</i> , <i>δ-proteobacteria</i> , <i>Planctomycetes</i> , <i>Unclassified bacteria</i> , <i>Acidobacteria</i> , <i>Acidobacteria</i> , <i>β-proteobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>OP11</i>			
	Avec cristaux MnO	<i>γ-proteobacteria</i> , <i>α-proteobacteria</i> , <i>Unclassified bacteria</i> , <i>Planctomycetes</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Acidobacteria</i> , <i>δ-proteobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Nitrospirae</i> , <i>Gemmatimonadetes</i>			
Plancher Océanique (Faille Pacifique Est)	Basalte	<i>γ-proteobacteria</i> , <i>α-proteobacteria</i> , <i>δ-proteobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Planctomycetes</i> , <i>Acidobacteria</i> , <i>Gemmatimonadetes</i>	Clonage en T-RFLP du gène 16S et séquençage	GeoChip pour trouver des gènes fonctionnels	Mason et al., 2009
Faille océanique (Pacifique Nord)	Basalte (palagonite, ferrihydrite, goéthite, hématite, magnétite)	<i>α-proteobacteria</i> , <i>γ-proteobacteria</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>β-proteobacteria</i>	Approche cultivable et séquençage du gène 16S		Cockell et al., 2010a
Milieux forestiers					
Sol forestier (Florence)	Grès de différente taille	Pas de caractérisation taxonomique mais profils métaboliques différents	Analyse PLFA et analyse BIOLOG®		Certini et al., 2004
Sol (Australie)	Mica, Basalte, Roche phosphatée	Pas de caractérisation taxonomique	Microcosmes (Plante, minéraux, Plante + minéraux) / analyse en ARISA (automated ribosomal intergenic spacer analysis)	Mesure du pH et de l'activité déshydrogénase des bactéries	Carson et al., 2007
Sol (Australie)	Mica, basalte, roche phosphatée	Pas de caractérisation taxonomique mais les ribotypes sont différents d'un minéral à l'autre	ARISA		Carson et al., 2009
Forêt de Luquillo (Puerto Rico)	Régolite	Pas de caractérisation taxonomique, observation de bactéries à la surface de la régolite	Microscopie électronique à balayage		Minyard et al., 2011
Sol forestier (Morvan, France)	Apatite (sous hêtre)	<i>α-proteobacteria</i> , <i>β-proteobacteria</i> , <i>Acidobacteria</i> , <i>γ-proteobacteria</i> , <i>unidentified Proteobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Unclassified bacteria</i> , <i>Planctomycetes</i>	Clonage / séquençage du gène 16S		Uroz et al., 2011
	Apatite (sous épicéa)	<i>α-proteobacteria</i> , <i>β-proteobacteria</i> , <i>Acidobacteria</i> , <i>γ-proteobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Unclassified bacteria</i> , <i>Planctomycetes</i>			
	Plagioclase (sous hêtre)	<i>α-proteobacteria</i> , <i>β-proteobacteria</i> , <i>Acidobacteria</i> , <i>γ-proteobacteria</i> , <i>unidentified Proteobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Unclassified bacteria</i> , <i>δ-proteobacteria</i> , <i>Planctomycetes</i>			
	Plagioclase (sous épicéa)	<i>α-proteobacteria</i> , <i>β-proteobacteria</i> , <i>Acidobacteria</i> , <i>γ-proteobacteria</i> , <i>unidentified Proteobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Unclassified bacteria</i> , <i>Planctomycetes</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Deinococcus-Thermus</i>			
	Phlogopite et quartz (sous hêtre)	<i>α-proteobacteria</i> , <i>β-proteobacteria</i> , <i>Acidobacteria</i> , <i>γ-proteobacteria</i> , <i>unidentified Proteobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Unclassified bacteria</i> , <i>Planctomycetes</i>			
	Phlogopite et quartz (sous épicéa)	<i>α-proteobacteria</i> , <i>β-proteobacteria</i> , <i>Acidobacteria</i> , <i>γ-proteobacteria</i> , <i>unidentified Proteobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Unclassified bacteria</i> , <i>δ-proteobacteria</i> , <i>Planctomycetes</i>			

¹ La formule chimique des minéraux est disponible dans le tableau 1.2² La liste des phylums pour chaque étude est classée du phylum le plus abondant au moins abondant.

Shinner (1999) qui avaient démontré que l'aluminium était toxique pour les bactéries provoquant une réduction de leur capacité d'adhésion et de leur croissance.

L'ensemble de ces travaux suggère qu'un certain déterminisme des communautés bactériennes pour la colonisation des surfaces des minéraux existe. Les communautés bactériennes coloniseraient tel ou tel minéral selon sa composition minéralogique et par extension, selon son contenu nutritif. Borin *et al.* (2009) ont même suggéré que les minéraux représentaient des « oasis » (i.e. « oasis of life ») dans des environnements extrêmes et relativement pauvres en nutriments tels le désert Arctique par exemple où la plupart des minéraux se trouvent en surface. Dans les écosystèmes pauvres en nutriments, cette « sélection » du minéral par les bactéries a également été observée sur des minéraux enfouis dans le sol (Uroz *et al.*, 2012). **Cependant, en plus de la minéralogie, il existe beaucoup d'autres facteurs qui influencent la colonisation minérale par les bactéries tels que les variations de la température au sein du minéral, l'exposition aux UV, le pH, l'hygrométrie ou encore la structure physique du minéral impliquant des facteurs tels que sa taille ou sa porosité.** Certains de ces facteurs sont plus ou moins pertinents en fonction de la localisation des minéraux : à l'air libre (montagnes, monuments) ou enfouis (sol, océan).

4.3. Les facteurs influençant la colonisation des minéraux.

4.3.1 Les facteurs environnementaux

La colonisation des minéraux par les microorganismes **a été peu étudiée d'un point de vue environnemental, notamment concernant les bactéries.** Néanmoins, l'influence de facteurs environnementaux comme l'hygrométrie, l'exposition au vent, ou la température, peuvent être déduits par comparaison d'analyses de diversité. Par exemple, l'analyse des communautés bactériennes colonisant du grès dans différentes régions du monde montre une structuration taxonomique différente de ces communautés (Miller *et al.*, 2009 ; Gaylarde *et al.* 2012). Le grès provenant d'une cathédrale en Espagne ou au Portugal montre une communauté bactérienne dominée par les *Actinobacteria* et les *Bacteroidetes* (Miller *et al.*, 2009) tandis que le grès provenant d'un mur de la cité d'Angkor au Cambodge présente une communauté bactérienne dominée par les *Proteobacteria* et les *Firmicutes* (Gaylarde *et al.*, 2012). La comparaison de ces résultats suggère, en dehors d'un potentiel effet réservoir de l'environnement qui sélectionnerait des communautés différentes, que **les communautés bactériennes associées à la surface des minéraux seraient influencées par des facteurs environnementaux tels que l'hygrométrie ou la température.** L'influence de l'hygrométrie sur la

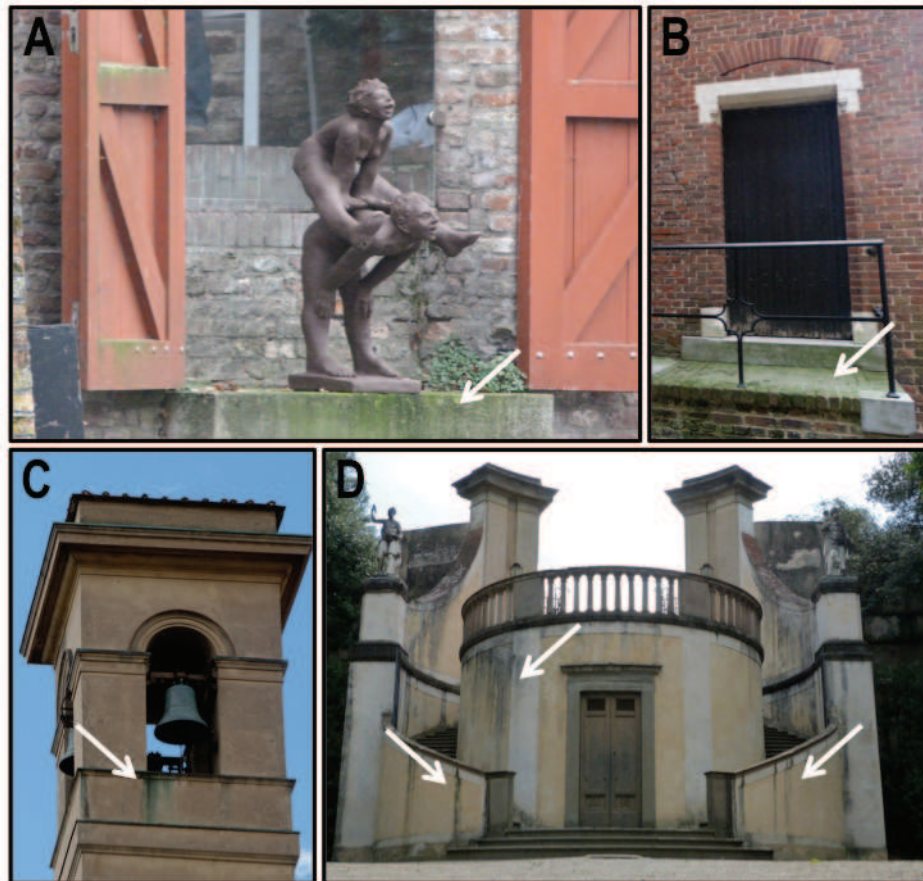


Figure 1.3 : Colonisation de surfaces minérales soumises aux conditions environnementales.

Les flèches blanches indiquent les biofilms qui se sont développés sur les surfaces minérales et qui sont situés, en général, au niveau où de l'eau stagne ou s'écoule lorsqu'il pleut. **A)** Statue au bord du canal Albert à Liège (Belgique). **B)** Porte avec un palier colonisé par les microorganismes à Liège (Belgique). **C)** Clocher d'une église à Florence (Italie). **D)** Escalier menant à une terrasse des jardins de Boboli à Florence (Italie). Sur cette photo on voit bien la colonisation des microorganismes là où l'eau s'écoule lorsqu'il pleut.

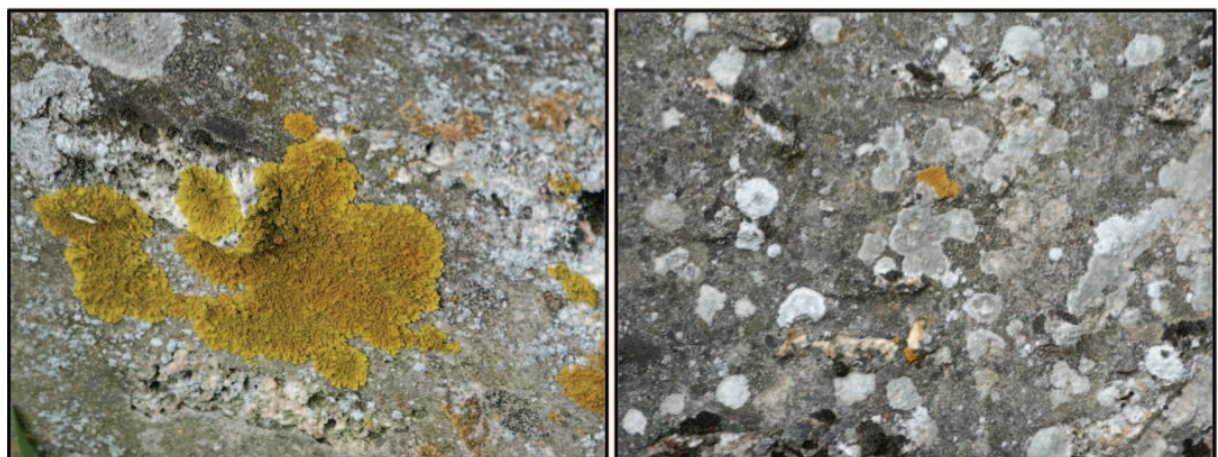


Figure 1.4 : Lichens colonisant les murs de l'Eglise de Doue (XIII^e s.) en Seine-et-Marne (France).

colonisation des minéraux a en effet été démontrée dans d'autres études. A grande échelle, plusieurs exemples peuvent être observés dans les villes ou aux abords des canaux fluviaux. Au niveau des zones d'humidité, il est en effet assez facile d'observer la colonisation des pierres par des microorganismes tels que les cyanobactéries par exemple, tandis que les zones moins exposées à l'humidité seront plus facilement colonisées par des lichens (Figures 1.3 et 1.4). A une échelle beaucoup plus fine, Carson *et al.* (2010) ont démontré en faisant varier la texture d'un sol (argile ou quartz) et donc sa capacité à retenir l'eau, que plus le sol contenait d'argile, plus il avait la capacité de retenir l'eau et plus la diversité bactérienne augmentait.

La température et l'exposition aux UV sont également des facteurs environnementaux déterminants, notamment pour la colonisation des minéraux de surface, la lumière ne pouvant pas atteindre les minéraux enfouis dans le sol ou ceux situés dans les océans. En Irlande, afin de comprendre les facteurs environnementaux contrôlant la colonisation des roches affleurantes, deux blocs de pierre ont été disposés face au Nord ou au Sud à la surface du sol, dans neuf sites différents. Les auteurs ont observé que la face Nord des blocs de pierre étaient colonisés plus rapidement et par une diversité microbienne plus importante que la face Sud (Adamson *et al.*, 2012). En effet, la face Nord était non directement exposée à la lumière ce qui a eu pour conséquence de réduire l'intensité des variations de la température et l'exposition aux UV, facilitant ainsi la colonisation (Adamson *et al.*, 2012). De même, dans les milieux extrêmes tels que le désert Atacama (Chili), les microorganismes colonisent le dessous et l'intérieur de minéraux d'ignimbrite (débris de lave acide composé essentiellement de silice) jusqu'à un certain seuil défini par l'intensité de la pénétration de la lumière dans le minéral (Wierzchos *et al.*, 2012). Curieusement, les auteurs n'ont observé aucune colonisation à la surface de ces minéraux, probablement à cause de l'intensité des UV. Plus au Nord, dans le désert des Mojaves en Californie, la plupart des microorganismes ont été observés en dessous des minéraux de quartz qui, de part leur transparence, laissent pénétrer assez de lumière pour permettre leur colonisation par des organismes phototrophes (Schlesinger *et al.*, 2003). La même observation a été faite dans le désert Arctique du Canada. Des communautés microbiennes ont été observées en dessous de roches dolomitiques opaques et plus particulièrement aux bords des fissures (Cockell et Stokes, 2004). Les auteurs ont expliqué ce phénomène par l'action des cycles de gel-dégel qui augmentent la pénétration de la lumière au niveau des fissures facilitant ainsi la colonisation.

Toutes ces études démontrent que la température et l'exposition aux UV sont des facteurs environnementaux déterminants dans la colonisation microbienne des minéraux, notamment dans les milieux extrêmes. Cependant, dans le cas des écosystèmes forestiers, l'exposition aux UV et la



Figure 1.5 : Altération de surfaces minérales visibles à l'œil nu.

A) Mur de l'Eglise de Doue en Seine-et-Marne (France). **B)** Fresque murale (*sgraffiti*) située sur la façade d'un bâtiment à Florence (Italie).

température sont des facteurs qui sont relativement peu déterminants dans la colonisation des minéraux étant donné que ces derniers se trouvent enfouis dans le sol.

4.3.2 Les caractéristiques physiques et cristallographiques des minéraux

Au-delà des facteurs purement environnementaux, **la structure physique des minéraux** semble également influencer la colonisation en commençant par **leur taille**. En combinant une approche métabolique BIOLOG (CLPP) et une analyse des acides gras phospholipidiques (PLFA), une étude a démontré que les graviers (2 à 10 mm) présentaient des communautés bactériennes plus importantes et métaboliquement plus actives que celles retrouvées sur les cailloux (40 à 60 mm) (Certini *et al.*, 2004).

Un autre facteur inhérent à la structure physique des minéraux est **leur porosité**. La porosité des minéraux contrôle en partie la quantité d'eau circulant au niveau du minéral. La mesure de la porosité d'une roche volcanique a par exemple démontré que plus la roche était poreuse plus elle permettait la circulation et la rétention de l'eau ce qui contribuait à une plus grande diversité bactérienne (Kelly *et al.*, 2011). En plus de permettre une meilleure circulation de l'eau, la porosité d'une roche augmente les échanges gazeux avec l'atmosphère (Wierzchos *et al.*, 2012) favorisant ainsi la colonisation des roches à l'air libre, par des bactéries aérobies.

D'autres facteurs influençant la structure physique des minéraux ainsi que leur colonisation par les bactéries sont **leur âge** (Lysnes *et al.*, 2004) et **leur degré d'altération** (Santelli *et al.*, 2008) (Tableau 1.1). Les minéraux « âgés » ou altérés présentent en effet, des structures particulières à leur surface (rugosité de surface), principalement visibles au microscope à balayage, mais aussi dans certains cas, à l'œil nu (Figure 1.5).

D'autre part, *via* une méthode d'interférométrie verticale (VSI), il a été démontré que les creux à la surface d'une calcite apparaissaient comme des sites de haute énergie qui pouvaient favoriser l'attachement microbien (Davis et Lüttge, 2005). **Les charges électrostatiques peuvent en effet jouer un rôle important dans la colonisation des surfaces minérales**. Les surfaces minérales sont en général, chargées et le plus souvent positivement dans les conditions environnementales. Il s'agit (i) de charges permanentes liées à des substitutions dans les phyllosilicates, par exemple un ion Mg^{2+} remplacé par un ion Al^{3+} présent en solution, ou (ii) de charges de bordures liées à une rupture de la structure cristalline et qui sont dépendantes du pH et de la force ionique de la solution (Espiau, 1983).

En considérant que la plupart des minéraux sont chargés positivement (Yee *et al.*, 2000 ; Lower *et al.*, 2000 ; Roberts *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2005) et que, de façon générale, les cellules bactériennes sont chargées négativement (Harden et Harris, 1953), les charges électrostatiques des deux surfaces (minérale et cellulaire) font qu'elles sont naturellement attirées l'une vers l'autre (Loi de Coulomb). Par exemple, les bactéries *Thiobacillus ferrooxidans* et *Shewanella oneidensis* colonisent préférentiellement les oxydes de fer notamment à cause des charges électrostatiques existant entre elles et la surface minérale (Blake II, 1994 ; Devasia *et al.*, 1993 ; Neal *et al.*, 2005). Un autre exemple est l'application d'un faible courant électrique qui permet de « détacher » les cellules bactériennes d'un scalpel chirurgical ou d'une électrode en or et donc, de rompre les liaisons coulombiennes, l'arrêt du courant ayant pour effet la ré-adhésion de ces mêmes cellules (Hong *et al.*, 2008 ; Van der Borden *et al.*, 2004 ; Busalmen et de Sanchez, 2005). Les charges électrostatiques constituent donc un facteur permettant l'adsorption des cellules bactériennes à la surface du minéral. On parle alors de « surface réactive » du minéral (Barker *et al.*, 1997). La surface réactive du minéral peut notamment être influencée par le pH.

Yee *et al.* (2000) ont démontré que plus le pH était acide, plus l'adsorption bactérienne était importante. Plus récemment, Wang *et al.* (2011) ont démontré que l'adsorption d'*Acidithiobacillus ferrooxidans* était optimale à un pH compris entre 1 et 3. A pH acide, la surface des cellules bactériennes est dominée par des groupements R-COOH qui deviennent de plus en plus hydrophobes avec la diminution du pH. Le fait que les cellules soient de plus en plus hydrophobes augmente leur attirance électrostatique pour la surface du minéral (Yee *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2011). Au-delà du pH, ces deux auteurs ont également mis en évidence l'effet de la force ionique, définie par la quantité d'ions solubles. Ils ont effectivement chacun observé qu'une augmentation de la force ionique conduisait à une diminution de l'attraction des cellules bactériennes pour la surface du minéral. Ceci suggère que l'interaction entre les bactéries et le minéral est limitée si la concentration en électrolytes est trop élevée (Yee *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2011). Une autre hypothèse serait que si les ions sont en solution, les bactéries n'ont pas besoin d'adhérer au minéral pour les atteindre. L'implication des charges de surfaces sont une des nombreuses hypothèses pouvant mener à la colonisation des surfaces minérales par les bactéries, néanmoins, cette hypothèse reste dépendante des conditions du milieu, du minéral et de l'état physiologique des bactéries.

Tous ces résultats montrent que les roches et les minéraux peuvent **fournir une surface stable avec un contenu nutritif et de l'eau et ainsi être considérés comme un habitat potentiel pour les communautés bactériennes.**

4.4. Les communautés bactériennes associées la surface des minéraux et leur capacité à altérer les minéraux

4.4.1 Données taxonomiques et fonctionnelles

L'étude de la capacité d'altération des communautés microbiennes associées à la surface des minéraux a surtout concerné les lichens et les champignons (Danin *et al.*, 1982 ; Ascaso *et al.*, 1998 ; Chen *et al.*, 2000 ; Ortega-Morales *et al.*, 2000 ; Gadd, 2007 ; de los Rios *et al.*, 2009). En ce qui concerne les **bactéries associées à la surface des minéraux, leurs caractéristiques fonctionnelles et taxonomiques ont été très peu étudiées** (Tableau 1.1). En fait, la capacité à altérer les minéraux a surtout été démontrée pour des souches bactériennes provenant du sol et de la rhizosphère ou de la mycorrhizosphère d'arbres (Davis *et al.*, 2007 ; Puente *et al.*, 2004 ; Calvaruso *et al.*, 2010 ; Collignon *et al.*, 2011 ; Uroz *et al.*, 2007, 2011a). Toutefois, quelques études se sont attachées à déterminer les caractéristiques fonctionnelles de bactéries isolées de la surface des minéraux. Par exemple, Cockell *et al.* (2010b) ont démontré que des bactéries du genre *Arthrobacter* et isolées d'un dépôt d'évaporite (roche saline composée de sulfate et de chlorure de sodium formée lors de l'évaporation de l'eau de mer) dans un désert polaire, étaient capables de former des cristaux de gypse [$\text{Ca}(\text{SO}_4) \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$] à partir d'un milieu enrichi en CaSO_4 en condition *in vitro* altérant ainsi les minéraux par néoformation.

Concernant la capacité de ces bactéries à dissoudre les minéraux, Gonzalez *et al.* (1999) ont démontré que des bactéries appartenant au genre *Bacillus sp.* et isolées d'une peinture murale en Espagne étaient capables de dissoudre de l'hématite (Fe_2O_3). De la même façon, la capacité d'altérer les minéraux a été testée pour des bactéries provenant des murs de brique de la ville de Nanjing Ming en Chine (Wang *et al.*, 2011). Les auteurs ont testé 93 souches pour leur capacité à libérer du Si à partir de briques réduites en poudre et 28 se sont révélés efficaces. Ces souches bactériennes potentiellement altérantes appartenaient au phyla des γ - et β -*proteobacteria* (Wang *et al.*, 2011). Dans un environnement moins anthropisé, Frey *et al.* (2010) ont étudié la capacité d'altération pour des souches bactériennes provenant d'un granite du glacier de Damma en Suisse. En utilisant une analyse par spectrométrie de masse par torche à plasma (ICP-MS), ces auteurs ont démontré que des souches bactériennes appartenant aux genres *Polaromonas*, *Janthinobacterium*, *Arthrobacter* et *Leifsonia* étaient capables de dissoudre du granite en poudre (granite composé d'albite, quartz, microcline, muscovite, biotite, épidote, chlorite et magnétite (Tableau 1.2)). Ils ont observé que ces souches bactériennes étaient capables de consommer du glucose et d'acidifier le milieu *via* la production d'acide oxalique et de cyanure d'hydrogène (HCN). En 2011, une étude réalisée sur du granite venant du même glacier a révélé que cette roche était principalement colonisée par des *Proteobacteria* et plus

précisément des *β -proteobacteria* (Lapanje *et al.*, 2012). Ces auteurs ont également démontré que des souches bactériennes appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Collimonas* et *Janthinobacterium* et isolées de la surface du granite, étaient elles aussi capables de dissoudre du granite en poudre (Lapanje *et al.*, 2012). Une autre étude d'Herrera *et al.* (2008), a montré que des souches bactériennes appartenant au phylum des *β -proteobacteria* et provenant de la surface d'une obsidienne étaient capables d'altérer de la rhyolite (roche volcanique) en condition *in vitro*. **Toutes ces études tendent à penser que les bactéries appartenant au phylum des *β -proteobacteria* et plus précisément à la famille des *Burkholderiales* (*Janthinobacterium*, *Polaromonas*, *Collimonas*), sont capables d'altérer les minéraux.**

D'autre part, bien que provenant du sol, de la rhizosphère ou de la mycorrhizosphère, des souches bactériennes appartenant à la famille des *Burkholderiales*, et aux genres *Collimonas* et *Burkholderia*, ont été démontrées comme étant très efficaces pour altérer les minéraux (Uroz *et al.*, 2007, 2009). En utilisant un test en microplaque dans lequel les souches bactériennes se trouvent en contact avec un minéral pour toute source de fer (biotite, cf. Figure 4.3), il est possible d'estimer la capacité d'altération de ces souches en mesurant le taux de fer libéré. De cette manière, Uroz *et al.* (2007), ont démontré que la mycorrhizosphère de *Scleroderma citrinum* sous chêne abritait une forte proportion de souches bactériennes potentiellement altérantes et appartenant pour la plupart aux genres *Burkholderia* et *Collimonas*. En utilisant le même test en microplaque, Calvaruso *et al.* (2010) ont également démontré que les plus forts potentiels d'altération étaient observés chez les mêmes genres bactériens. Malgré toutes ces études, **aucun gène impliqué dans la fonction d'altération des bactéries n'a pu être identifié.**

5. Objectifs de la thèse

Nous avons vu dans cette introduction que **l'altération des minéraux du sol constituait une des principales sources de nutriments nécessaires au bon fonctionnement des écosystèmes forestiers pauvres en nutriments**. A l'heure actuelle, **la part biologique de cette altération est attribuée en grande partie aux racines des arbres et surtout aux champignons du sol**. Cependant, nous avons vu que **les communautés bactériennes pouvaient également jouer un rôle majeur dans l'altération minérale et ce, notamment dans la rhizosphère et la mycorrhizosphère des arbres**. **Les minéraux des écosystèmes forestiers pourraient également constituer une niche écologique potentielle pour les communautés bactériennes impliquées dans l'altération minérale**. Néanmoins et à ce jour, peu d'informations sont disponibles sur **les caractéristiques taxonomiques et fonctionnelles des communautés bactériennes colonisant les minéraux**. Par ailleurs, **la disponibilité en nutriments serait un facteur potentiel pouvant influencer la capacité d'altération des communautés bactériennes du sol**.

Le travail développé dans ma thèse s'est donc articulé autour de deux objectifs visant à palier les manques relatifs aux communautés bactériennes colonisant la surface des minéraux:

- **Objectif 1** : Quelles sont les communautés bactériennes qui colonisent la surface des minéraux des sols forestiers ? Ont-elles des caractéristiques métaboliques et/ou fonctionnelles particulières ?
- **Objectif 2** : Quelle est l'influence de la disponibilité en nutriments sur la structuration des communautés bactériennes altérantes du sol et sur leur efficacité à altérer les minéraux?

CHAPITRE 2 :
CARACTERISATION TAXONOMIQUE ET FONCTIONNELLE
DES COMMUNAUTES BACTERIENNES ASSOCIEES
A LA SURFACE DES MINERAUX DU SOL
D'UN ECOSYSTEME FORESTIER PAUVRE EN NUTRIMENTS

1. Introduction

En dehors des apports liés à la pluie, aux dépôts atmosphériques et au recyclage de la matière organique *via* la dégradation des feuilles et des racines mortes, les minéraux du sol constituent la principale source de nutriments inorganiques nécessaires au fonctionnement des écosystèmes forestiers. Cependant, ces nutriments sont piégés dans la structure cristalline des minéraux et, par conséquent, ne sont pas directement accessibles aux racines des arbres. Un processus appelé altération minérale¹ mettant en œuvre divers facteurs abiotiques ou biotiques tels que les bactéries du sol, permet la libération de ces cations nutritifs. Plusieurs études ont effectivement mis en évidence que l'altération minérale par les microorganismes du sol, et plus particulièrement par les bactéries, affectaient le cycle des ions ainsi que la nutrition des plantes en libérant des nutriments essentiels tels que le fer, le calcium, le phosphore, le magnésium ou encore le potassium à partir des minéraux (Barker et al, 1997 ; Calvaruso et al, 2006). De même, il a été démontré que les champignons jouaient également un rôle dans l'altération minérale (Paris *et al.*, 1996 ; Yuan *et al.*, 2004 ; Smits *et al.*, 2005).

Durant la dernière décennie, les communautés bactériennes colonisant les roches et les minéraux ont fait l'objet de plus en plus d'études dans des environnements divers et variés tels que les déserts, les fonds océaniques, les glaciers, les affleurements de montagne ou encore les monuments de notre patrimoine architectural (Frey *et al.*, 2010 ; Santelli *et al.*, 2008 ; Herrera, 2008 ; Wang *et al.*, 2011). Paradoxalement, les communautés bactériennes colonisant les minéraux des sols des écosystèmes forestiers n'ont été que peu étudiées. Pourtant, de part leur potentiel nutritif, ces minéraux sont suspectés d'être une niche écologique d'importance pour les communautés bactériennes des écosystèmes forestiers (Uroz *et al.*, 2012). Si l'effet sélectif des minéraux sur les communautés bactériennes se confirmait, le rôle joué par les communautés bactériennes dans les cycles biogéochimiques et plus particulièrement dans le processus d'altération minérale et ce, dans un environnement exploité et où la principale source de nutriment sont les minéraux du sol, deviendrait capital. Cependant, peu d'informations sont actuellement disponibles sur les communautés bactériennes colonisant les minéraux du sol des écosystèmes forestiers, que ce soit au niveau taxonomique, fonctionnel ou métabolique. En particulier, une question majeure reste en suspens : ces communautés bactériennes ont-elles la capacité d'altérer les minéraux ?

¹Dissolution des minéraux: Passage des cations de la structure des minéraux à l'état d'ions dissous dans le sol.

2. Objectifs

A mon arrivée en thèse, la capacité d'altérer les minéraux n'avait été démontrée que pour des bactéries telluriques provenant d'habitats tels que la rhizosphère, la mycorrhizosphère ou le sol global (Calvaruso *et al.*, 2006 ; Uroz *et al.*, 2007 ; Puente *et al.*, 2004). Aucune étude n'avait été faite en ce sens sur les communautés bactériennes colonisant de la surface des minéraux. Dans ce contexte, l'objectif de mon travail a été de démontrer que la surface des minéraux du sol constitue une niche écologique à part entière pour les communautés bactériennes des sols: la minéralosphère, qui doit être considérée comme telle au même titre que la rhizosphère ou la mycorrhizosphère. Les différentes analyses développées dans ce chapitre s'attachent donc à mettre en évidence que les surfaces des minéraux sont colonisées par des communautés bactériennes spécifiques d'un point de vue taxonomique, métabolique et fonctionnel.

3. Méthodes employées

La stratégie retenue pour tester l'hypothèse d'une sélection de communautés bactériennes particulières par le minéral a été de combiner des approches de biogéochimie, de biologie moléculaire et de microbiologie. Parmi les minéraux contenus dans le sol, un minéral présent sur le site expérimental de Breuil-Chenue, l'apatite, a été sélectionné. Sa composition chimique est la suivante : $1.8 \text{ g.kg}^{-1} \text{ SiO}_2$, $0.5 \text{ g.kg}^{-1} \text{ Al}_2\text{O}_3$, $0.8 \text{ g.kg}^{-1} \text{ Fe}_2\text{O}_3$, $546.1 \text{ g.kg}^{-1} \text{ CaO}$, $0.4 \text{ g.kg}^{-1} \text{ MgO}$, $2.7 \text{ g.kg}^{-1} \text{ Na}_2\text{O}$, $0.1 \text{ g.kg}^{-1} \text{ MnO}$ et $410.3 \text{ g.kg}^{-1} \text{ P}_2\text{O}_5$ (Turpault *et al.*, 2009). Ce minéral constitue la principale ressource en phosphore du sol et contient également une grande partie du calcium. Par ailleurs, l'apatite se caractérise par une vitesse de dissolution relativement rapide en comparaison des phyllosilicates par exemple, permettant de mener une étude à court terme, compatible avec des travaux de recherche. Les grains d'apatite utilisés dans cette étude proviennent du Mexique (Durango) et ont été concassés, calibrés, nettoyés et passés aux ultrasons avant leur utilisation.

Dans la pratique, des sachets avec un maillage de $50\mu\text{m}$, ne laissant pas passer les racines des arbres, contenant des grains d'apatite et préalablement pesés ont été enterrés dans l'horizon organo-minéral ($\pm 10\text{cm}$) sur le site expérimental de Breuil-Chenue, dans le Morvan (58). Les minéraux ont été enterrés sous cinq essences d'arbre différentes : le hêtre, l'épicéa, le pin Laricio, le taillis sous futaie et le sapin de Douglas. Après quatre ans d'incubation dans les conditions du sol, plusieurs approches ont été mises en place.

BOX 1 : Le pyroséquençage 454.

Au cours de la dernière décennie, nous avons assisté à l'émergence de nouvelles méthodologies de séquençage qui ont évolué en fonction des connaissances acquises dans diverses disciplines telles que la physique, l'informatique ou les biotechnologies. Ces Nouvelles Technologies de Séquençage (NTS) ont été élaborées afin de réduire le coût et le temps nécessaire pour séquencer un génome complet. L'une des technologies les plus probantes à ce jour est la technologie 454 qui s'appuie sur la méthode du pyroséquençage. Cette méthode de séquençage a été mise au point pour la première fois en 1988 (Hyman et al.) et se déroule comme suit (Figure A) :

- Les nucléotides sont ajoutés un à un au mélange réactionnel, si le nucléotide ajouté correspond à celui attendu par l'ADN polymérase alors il est incorporé au brin en cours de synthèse et libère un pyrophosphate (PPi).
- L'ATP sulfurylase transforme le PPi en ATP qui est alors couplé à une luciférine par une luciférase ce qui produit de l'oxyluciférine et un signal lumineux.
- Ce signal lumineux est capté par un capteur CCD (Charge-Coupled Device) puis reproduit sous forme d'un pic sur le pyrogramme. La hauteur du pic est fonction de l'intensité du signal qui est proportionnel au nombre de nucléotides incorporés en même temps.

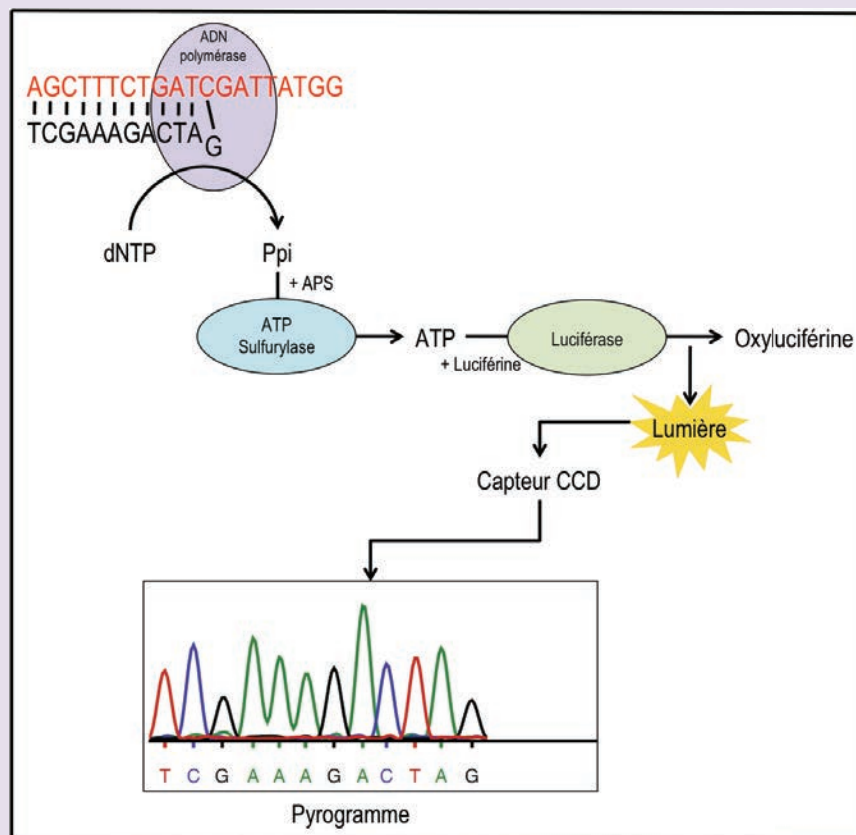


Figure A: Principe de la technique de pyroséquençage.

Bien que cette technique permette un séquençage plus rapide que celle de Sanger, elle présente le désavantage de ne permettre la lecture que de 100pb de la séquence d'intérêt.

En 2005, la société Life Science a repris la technique de pyroséquençage, l'a miniaturisée et l'a améliorée permettant ainsi de séquencer 300 000 brins en même temps et de lire jusqu'à 500bp. Depuis, elle n'a cessé d'améliorer sa technique. Le principe est le suivant (Figure B):

- L'ADN d'intérêt (génomique, mitochondrial, amplicons,...) est fragmenté par nébulisation. Deux adaptateurs (A et B) sont ensuite ajoutés par ligation aux deux extrémités des fragments obtenus.
- Des microbilles présentant à leur surface des amorces complémentaires à l'un des adaptateurs sont mises en émulsion en présence des réactifs de PCR et de l'ADN à séquencer. Une microbille correspond à une molécule d'ADN ce qui permet une amplification clonale de chaque fragment.
- Après amplification, les microbilles porteuses d'ADN simple brin sont déposées sur une plaque en fibre optique contenant environ 1,4 millions de puits. De par leur diamètre, ces puits ne permettent le dépôt que d'une seule microbille par puits. Le séquençage se fait selon le principe décrit plus haut. L'émission de luminescence se fait *via* une caméra CCD.
- La lecture des séquences se fait en temps réel. A la fin du séquençage les données obtenues peuvent être traitées par des logiciels bioinformatiques tels que MOTHUR (Schloss et al., 2008).

Le pyroséquençage étant basé sur une amplification de l'ADN par PCR, il faut garder à l'esprit qu'une erreur de l'ADN polymérase n'est pas à exclure. Lors de mon arrivée en thèse, la dernière technologie de la société Life Sciences était la technologie 454 FLX Titanium dont le séquençage était fiable à 99,995%.

D'autres techniques de séquençage à haut débit existent tels que les technologies SOLEXA, ILLUMINA ou encore ION TORRENT qui peuvent présenter certains avantages par rapport à la technologie 454 FLX Titanium (nombre de séquences lues, technique, % de fiabilité...). Cependant, dans le cadre de ma thèse, le choix de la technologie 454 FLX Titanium a été motivé par son ancienneté et par le fait que parmi toutes ces technologies, c'était la seule à pouvoir séquencer des fragments allant jusqu'à 500pb.

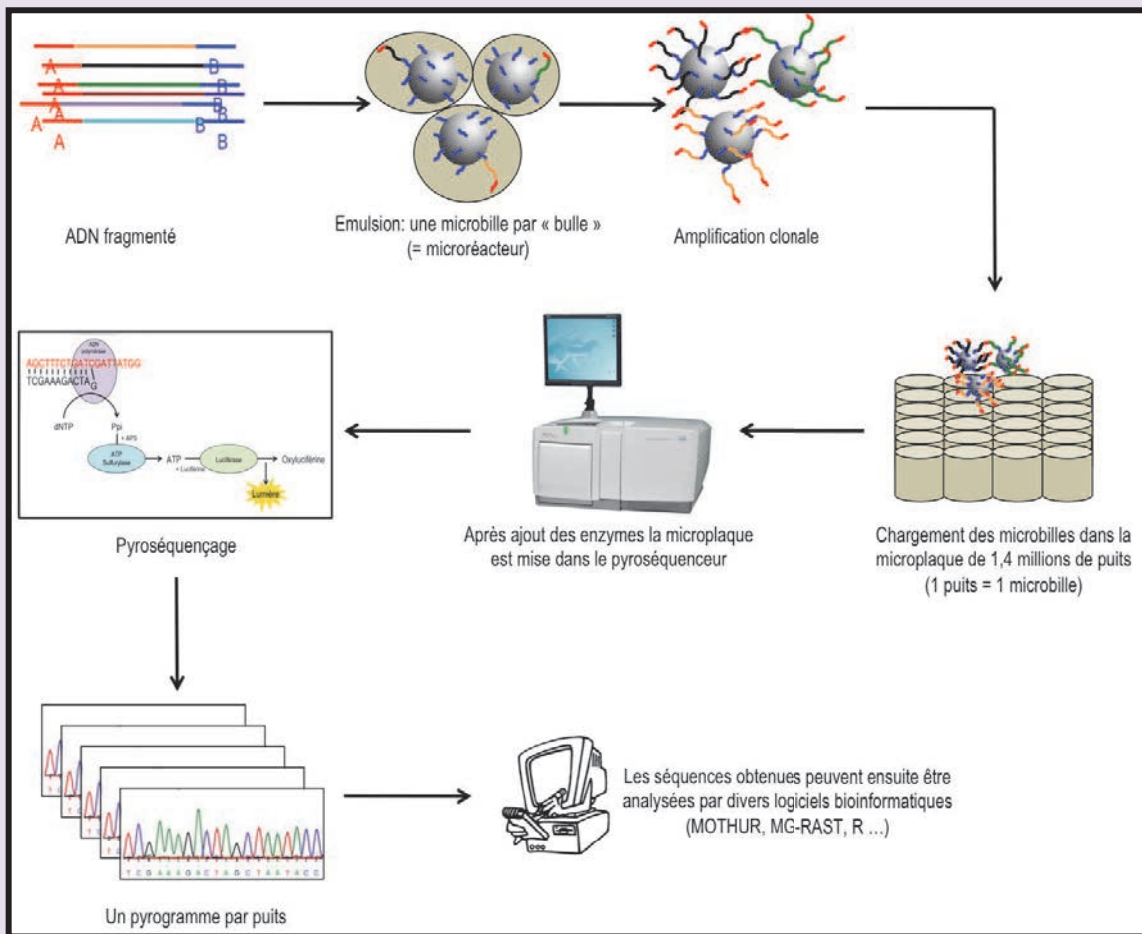


Figure B : Principe de la technologie 454.

- Une approche géochimique : les grains d'apatite ont été pesés avant et après incubation dans les conditions du sol, afin de déterminer leur taux de dissolution et certains grains ont été observés au microscope électronique à balayage (MEB)(observations et mesures réalisées par MP. Turpault).
- Une approche non-cultivable : l'ADN génomique (ADNg) a été extrait des communautés microbiennes associées à la surface des minéraux et du sol environnant. Les grains d'apatite ont été lavés avant l'extraction afin d'obtenir uniquement l'ADNg des communautés microbiennes fortement associées à leur surface. Une amplification de la région V5-V6 du gène de la petite sous-unité de l'ARN ribosomique (gène 16S) a été réalisée, et les amplicons générés ont été séquencés via un quart de run de pyroséquençage de type GS-FLX 454 Titanium (BOX 1).
- Une approche cultivable: Une collection d'isolats bactériens a été réalisée à partir de 250 mg d'apatite collectée sous chaque essence. Ces isolats bactériens ont été testés pour leur capacité à altérer les minéraux via un biotest en microplaque permettant de mesurer la capacité des isolats à altérer un minéral largement présent dans les sols : la biotite. L'apatite n'a pas été utilisée comme biotest, car à ce jour aucun biotest n'a été mis au point avec ce minéral. De plus, plusieurs tests montrent que les bactéries hétérotrophes capables d'altérer un minéral donné en présence d'une source de carbone sont aussi capables d'altérer d'autres minéraux (Balland *et al.*, 2010). L'environnement minéral étant relativement pauvre en carbone, des analyses métaboliques via des microplaques BIOLOG® ont aussi été réalisées sur un sous échantillon des souches isolées. Enfin le séquençage du gène 16S de ces souches a permis leur identification taxonomique.

4. Synthèse des résultats

Cette étude constitue, à ma connaissance, **une des premières démonstrations de l'existence de la niche minéralosphère et, peut-être, la seule combinant les différentes approches utilisées.** Tout d'abord, l'approche non-cultivable a permis de mettre en évidence que les communautés bactériennes isolées de la surface des minéraux étaient taxonomiquement différentes de celles du sol environnant suggérant la **sélection par le minéral de genres bactériens spécifiques tels que *Burkholderia*.** Ce genre bactérien déjà isolé sur le même site expérimental et caractérisé pour sa capacité à altérer les minéraux a été retrouvé en abondance par l'approche cultivable. Cette même approche a non seulement confirmé la présence de genres bactériens spécifiques à la surface des minéraux mais a également démontré que ces communautés avaient des **caractéristiques fonctionnelles et métaboliques adaptées à cet environnement.** Le criblage des souches bactériennes provenant de la surface de l'apatite pour la capacité à altérer les minéraux a révélé que la

plupart de ces souches avaient la capacité à altérer les minéraux, certaines souches ayant même un **fort potentiel d'altération**. Les analyses métaboliques basées sur les microplaques BIOLOG® ont démontré que ces communautés bactériennes ne métabolisaient que très peu de sources de carbone et avec une intensité faible, suggérant ainsi **un comportement oligotrophe et une adaptation à un environnement pauvre en nutriments disponibles et en matière organique**. Enfin, un des résultats originaux de cette étude combinant des approches moléculaires et la mesure globale de l'altération des minéraux d'apatite après 4 ans dans le sol est l'obtention d'une **corrélation positive et significative** entre l'abondance de séquences bactériennes appartenant au genre *Burkholderia* et la dissolution du minéral. Tous ces résultats corroborent l'hypothèse selon laquelle **les minéraux des sols forestiers constitueraient une niche écologique à part entière : la minéralosphère**.

5. Article: Abundance of Betaproteobacteria on mineral surfaces correlates with mineral weathering in forest soils.

C. Lepleux, M-P., Turpault, P., Oger, P., Frey-Klett et S. Uroz.

Publié dans : *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 78, Issue 19, July 2012, Pages 7114-7119.

Résumé

L'analyse de séquences de gène 16S obtenues par pyroséquençage a révélé une corrélation significative entre la dissolution de l'apatite et l'abondance des *β-proteobacteria* à la surface du minéral suggérant un rôle des bactéries appartenant à ce phylum dans l'altération minérale. L'approche cultivable a démontré que les bactéries les plus efficaces à altérer les minéraux appartenaient au genre *Burkholderia*.

Correlation of the Abundance of Betaproteobacteria on Mineral Surfaces with Mineral Weathering in Forest Soils

C. Lepleux,^{a,b} M. P. Turpault,^b P. Oger,^c P. Frey-Klett,^a and S. Uroz^{a,b}

INRA, UMR 1136 INRA Nancy Université Interactions Arbres Micro-organismes, Centre INRA de Nancy, Champenoux,^a INRA UR 1138 Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers, Centre INRA de Nancy, Champenoux,^b and Laboratoire de Géologie de Lyon, CNRS UMR 5276, Université de Lyon, ENS de Lyon, Lyon,^c France

Pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA gene sequences revealed a significant correlation between apatite dissolution and the abundance of betaproteobacteria on apatite surfaces, suggesting a role for the bacteria belonging to this phylum in mineral weathering. Notably, the cultivation-dependent approach demonstrated that the most efficient mineral-weathering bacteria belonged to the betaproteobacterial genus *Burkholderia*.

Mineral weathering plays a central role in nutrient-poor environments such as temperate forest ecosystems developed on acidic soils. Indeed, beside the contribution of atmospheric deposits and recycling of chemical elements, soil minerals constitute the main reservoir of nutritive cations for the long-lasting functioning of forest ecosystems (2, 36, 53). In this context, the release of key nutritive cations by mineral weathering processes is crucial. It is now established that, in addition to purely abiotic processes, soil microorganisms affect ion cycling and plant nutrition by releasing nutritive cations from minerals (5, 10, 20, 21, 52).

In the last decade, minerals and more generally terrestrial and oceanic rocks have been investigated for the presence of microbial communities on their surfaces (5, 6, 7, 14, 23, 24, 25, 27, 44). Due to their nutritive value, minerals can be considered a true ecological habitat giving excellent physical support for the development of specific microbial communities (8, 11, 12, 21, 30, 43, 54). As an example, Gleeson et al. (21) demonstrated that the taxonomic structure of the bacterial communities colonizing granite minerals was not homogenous and varied in relation with the mineral crystals (muscovite, plagioclase, K-feldspar, and quartz) present in this granite. Our knowledge of the bacterial communities colonizing soil minerals, in contrast to those colonizing rocks, is very limited (13, 54). However, through the mineral-weathering process, soil minerals impact the bioavailability of nutritive cations in the soil, and the modifications of the concentrations of the nutritive cations due to weathering are expected to influence the taxonomic and functional diversity of the bacterial communities colonizing mineral surfaces compared to those of the surrounding bulk soil (13, 40, 54).

To date, the ability to weather minerals has been demonstrated for a large range of bacterial strains isolated from various environments such as the rhizosphere of several plants (10, 32, 39, 49) and granite samples from the Damma glacier (19, 30). This ability was notably reported for bacteria belonging to the *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, and *Collimonas* genera (3, 19, 33, 46, 51, 56, 57). Among these isolates, strains that belong to the betaproteobacterial genera *Burkholderia* and *Collimonas* and that were isolated from forest soil were characterized by higher mineral-weathering efficacy (31, 49, 51). Given the current absence of marker genes identified with mineral-weathering functions, these two bacterial genera and more especially their relative abundance have been proposed as bioindicators of bacterial weathering potential in forest soils (53). However, all these conclusions need to be confirmed

for the mineral-associated bacterial communities in order to determine their mineral-weathering ability and their potential role in nutrient cycling in forest soils.

To investigate the bacterial communities colonizing and weathering minerals, pure and calibrated particles of apatite, one of the main accessory minerals encountered in Breuil-Chenue forest soil (34, 35, 41), were incubated in nylon bags for 4 years in the soil under five tree stands (beech [*Fagus sylvatica*], Norway spruce [*Picea abies*], Douglas fir [*Pseudotsuga menziesii* Franco], Corsican pine [*Pinus nigra* Arn. subsp. *laricio* Poiret var. *Corsicana*], and coppice with standards [CwS]). Due to protocol incompatibility and a low heterogeneity of bulk soil bacterial communities at the Breuil-Chenue site (52) (as determined by temporal temperature gradient gel electrophoresis [TTGE] [see Fig. S1 in the supplemental material]), a composite bulk soil (TBS) sample was generated. After 4 years, the dissolution level of these minerals was measured (1, 48). Genomic DNA (gDNA) was extracted from 250 mg of apatite particles or from the surrounding bulk soil using the PowerSoil DNA kit (MO BIO Laboratories, Inc.). Amplicon libraries targeting the V5-V6 hypervariable regions of the 16S rRNA gene were generated as described by Uroz et al. (52, 55). Pyrosequencing resulted in ca 230,000 reads which passed the length and quality criteria (16). MOTHUR was used to trim, denoise, and align the reads and to generate the operational taxonomic units (OTUs; 97% sequence similarity), as well as to perform the non-parametric analyses (45). Taxonomic affiliation was performed using MG-RAST (metagenome rapid annotation using subsystem technology) (37). For each tree stand, bacterial isolates were obtained from apatite surfaces and tested for their mineral-weathering abilities using a microplate bioassay as described by Uroz et al. (49). Biotite was used here instead of apatite as it was previously demonstrated that the same mineral-weathering bacterial strains efficiently weather a variety of minerals (2, 9, 25, 26, 50, 51). A portion of the 16S rRNA gene of each bacterial isolate was then

Received 27 March 2012 Accepted 9 July 2012

Published ahead of print 13 July 2012

Address correspondence to S. Uroz, uroz@nancy.inra.fr.

Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.00996-12

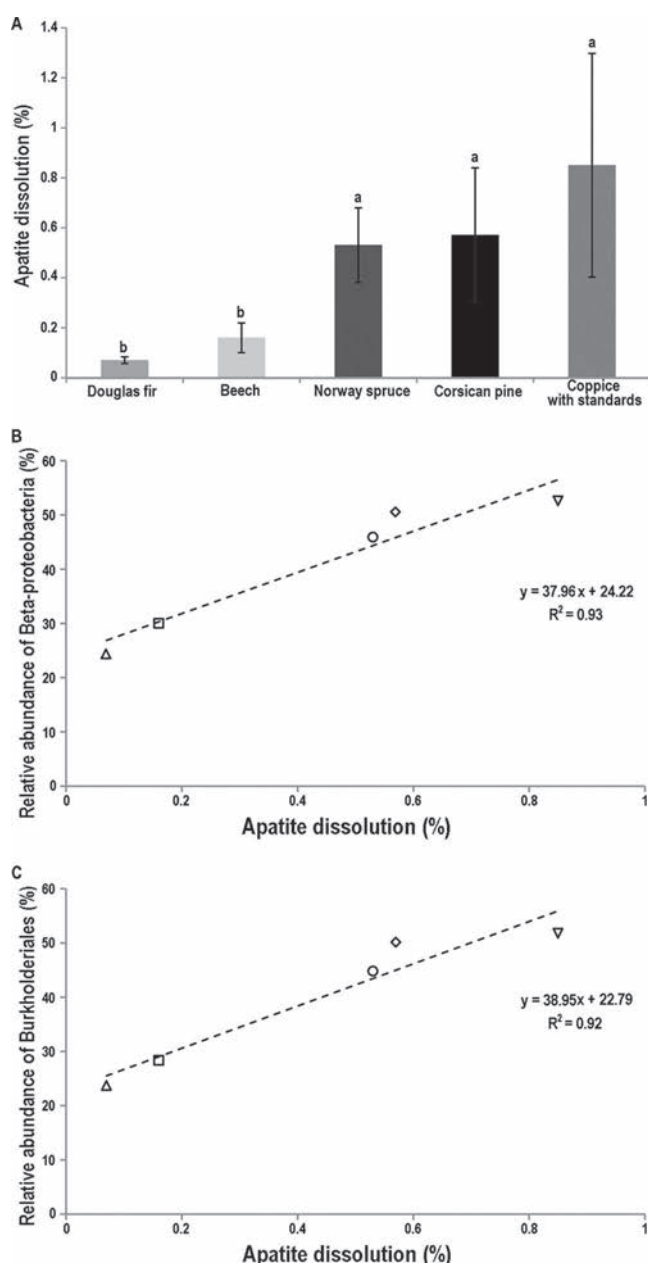


FIG 1 Apatite dissolution and relationship between the percentage of dissolution of apatite and the relative abundance of *Betaproteobacteria* and *Burkholderiales*. (A) Apatite dissolution. Bars represent the amount of apatite weight loss, i.e., the dissolution level, over the 4-year incubation period, expressed as percentages of the original weight. Bars associated with the same letters are not significantly different from each other according to a one-factor (tree species) ANOVA ($P = 0.0467$). (B) Relationship between the percentage of dissolution of apatite and the relative abundance of *Betaproteobacteria*. A positive and significant correlation between apatite dissolution and the abundance of 16S rRNA gene sequences assigned to the *Betaproteobacteria* class was found ($P = 0.0076$). (C) Relationship between the percentage of dissolution of apatite and the relative abundance of *Burkholderiales*. A positive and significant correlation between apatite dissolution and the abundance of 16S rRNA gene sequences assigned to the *Burkholderiales* family was found ($P = 0.0026$). The origins of the 16S rRNA gene sequences are indicated as follows: triangles, apatite below Douglas fir stand; squares, apatite below beech stand; circles, apatite below Norway spruce stand; diamonds, apatite below Corsican pine stand; inverted triangles, apatite below coppice with standards stand. The correlation between mineral dissolution and taxonomic classification or bacterial diversity was

sequenced using the universal primers pA and 907r (17, 29). The abilities of the bacterial isolates coming from apatite surfaces to use single carbon sources were tested using Biolog GEN III microplates. The effects of the tree stand on mineral dissolution were determined by analysis of variance (ANOVA) at a threshold P value of 0.05 and by the Fischer test using the Superanova software (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA). (For a complete description of the material and methods, see the supplemental material.)

After a 4-year incubation in the soils of the different tree stands, the most intensively weathered apatite particles were recovered from the coppice with standards (percentage of dissolution, $0.85\% \pm 0.4\%$), while the least-weathered particles were recovered from the Douglas stand ($0.07\% \pm 0.01\%$). The apatite particles recovered from the coppice with standards, Corsican pine, and Norway spruce stands were significantly more weathered than those recovered from the beech and Douglas stands, according to a one-factor ANOVA (tree species) test ($P = 0.0467$) (Fig. 1A). One hypothesis to explain these differences is that the tree species differentially impact soil minerals through geochemical modifications of the soil conditions (e.g., pH) (1). However, the conclusions obtained considering the soil conditions (see Table S1 in the supplemental material) were not so clear, suggesting the influence of potential macro- and microscale conditions or microorganisms colonizing the mineral surfaces.

Nonparametric analyses revealed that, for similar numbers of sequences, the highest number of OTUs was observed for the bulk soil environment (13,557 OTUs) (see Table S2 in the supplemental material). Apatite surfaces were characterized by fewer OTUs, ranging from 8,323 to 10,071 OTUs under the different stands, with the exception of Corsican pine, for which only 3,798 OTUs were observed. Similar curves were obtained for the apatite sampled in the different tree stands, except under Corsican pine, which showed the lowest complexity (see Fig. S2 in the supplemental material). The nonparametric estimators ACE, Chao1, and Shannon revealed the same trend (see Table S2 in the supplemental material).

Classification of the sequences demonstrated that the same 19 phyla were present in all the samples considered, among which 4 were numerically dominant, i.e., *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, and *Bacteroidetes*. The bulk soil environment was dominated by *Proteobacteria* (53%) and *Acidobacteria* (8.50%). The apatite surfaces under each tree stand considered were dominated by *Proteobacteria* (49.75% under the Douglas fir stand to 73.05% under the coppice with standards stand), *Bacteroidetes* (7.03% under the coppice with standards stand to 36.97% under the Corsican pine stand), and *Acidobacteria* (0.55% under the Corsican pine stand to 15.89% under the Douglas fir stand) (Fig. 2). A detailed analysis revealed that the proteobacteria were dominated by alphaproteobacteria in the bulk soil (29.02%) and by betaproteobacteria on the apatite surfaces (24.82 to 52.65%) (Fig. 2).

At the genus level, apatite surfaces appeared dominated by *Burkholderia* (12.8 to 37.6%), *Pedobacter* (4.5 to 16.4%), and *Chitinophaga* (2.8 to 12.6%), with the exception of the coppice with

analyzed by performing a linear regression analysis at a threshold P value of 0.05 with the Statview software (SAS Institute, Cary, NC). The different relative values (%) used in this study were transformed by arcsine square root for statistical and linear regression analyses.

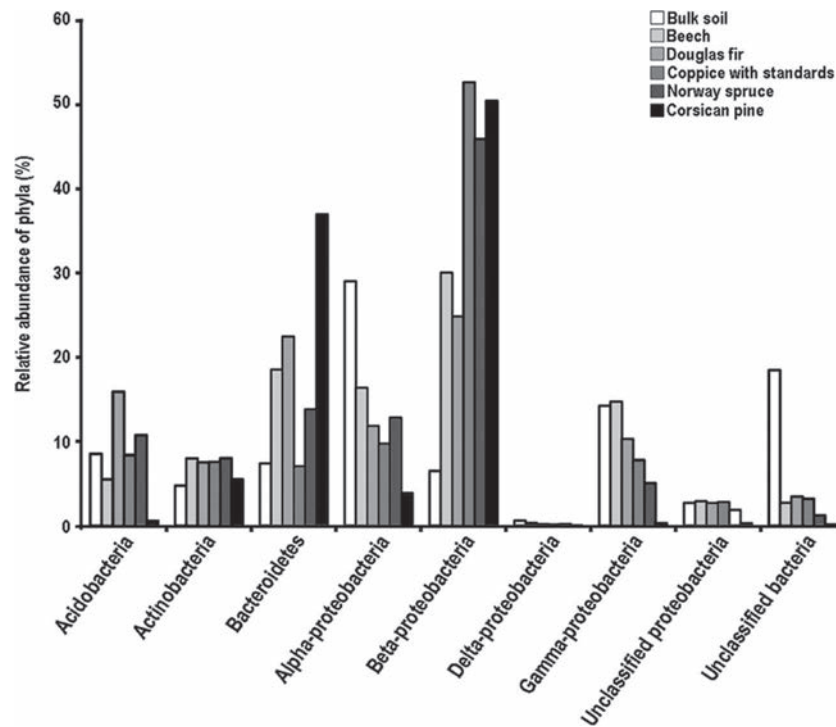


FIG 2 Relative abundances of the 9 most abundant phyla present at the apatite surface and in the surrounding bulk soil.

standards environment, where a predominance of sequences related to the betaproteobacteria from the *Oxalobacteraceae* family (*Herbaspirillum*, *Janthinobacterium*, and *Collimonas*; 16.11%) was observed (see Table S3 in the supplemental material). Only 1.60% of sequences related to the genus *Burkholderia* were recovered from the bulk soil, which was dominated by unclassified bacteria (ca. 13%). The relative distribution of phylotypes further differentiated the bulk soil and the mineralosphere. Among the 10 most abundant phylotypes detected on apatite surfaces, most belonged to the *Burkholderia* or *Collimonas* genus, known for mineral-

weathering efficacy (9, 15, 33, 49, 51, 56, 57) (Table 1). Interestingly, the same *Burkholderia* phylotype (Table 1) was the major phylotype occurring in all stands, but not the coppice with standards environment, where it ranked 12th.

Notably, two positive and significant correlations between the level of apatite dissolution and the abundance of 16S rRNA gene sequences assigned to the *Betaproteobacteria* class or to the *Burkholderiales* order were found (Fig. 1B and C). Moreover, a significant correlation was observed for the *Burkholderia* genus when the data from the coppice with standards stand were omitted from

TABLE 1 Relative abundance of the 10 most abundant phylotypes^a

Abundance ranking	Bacterium(a) to which phylotypes belong found in:					
	Bulk soil	Beech stand soil	Douglas fir stand soil	Coppice with standards stand soil	Norway spruce stand soil	Corsican pine stand soil
1	<i>Acidobacteria</i> bacterium	<i>Burkholderia</i> *	<i>Burkholderia</i> *	<i>Collimonas</i>	<i>Burkholderia</i> *	<i>Burkholderia</i> *
2	<i>Acidobacteria</i> bacterium	<i>Curtobacterium</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Collimonas</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>
3	<i>Acidobacteria</i> bacterium	<i>Dokdonella</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Collimonas</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i> bacterium
4	<i>Acidobacteria</i> bacterium	<i>Curtobacterium</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Collimonas</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>
5	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Oxalicibacterium</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i> bacterium
6	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Variovorax</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>
7	<i>Steroidobacter</i>	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i> bacterium	<i>Burkholderia</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i> bacterium
8	Gamma-proteobacterium	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i> bacterium	<i>Streptomyces</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i> bacterium
9	<i>Paenibacillus</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i> bacterium	<i>Burkholderia</i>	<i>Oxalicibacterium</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>
10	<i>Paenibacillus</i>	<i>Dokdonella</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Variovorax</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>

^a Analyses were performed at a 97% sequence similarity threshold and calculated using the MOTHUR software. Asterisks indicate the presence of the same phylotype (100% sequence similarity) of *Burkholderia* on apatite surfaces.

the analysis (data not shown). Santelli et al. (44) also reported that, in another environment, the abundance of bacteria was positively correlated with the mineral-weathering levels, the oldest and most weathered basaltic rocks harboring the highest microbial biomass, suggesting an impact on the mineralogy.

These observations should be taken with caution, since quantification and reproducibility of pyrosequencing results are still questioned. Indeed several studies have illustrated some of the limits of the pyrosequencing approach in phylogenomic studies (22, 59). For example, Zhou et al. (59) showed low reproducibility in technical and biological replicates from a mixed-grass prairie soil, demonstrating a net decrease of the shared OTUs between replicates when the number of replicates increases. Part of this heterogeneity is linked to the experimental procedure, including biases in gDNA preparation and PCR amplification, variable efficiency of barcoded primers, and pyrosequencing artifacts (6, 18, 47) or is attributed to sampling artifacts (52, 58). Altogether, these biases can lead to an artificial view of the distribution of the bacterial communities, and an overestimation of rare taxa (28). Regardless of these artifacts, several authors conclude that this approach is especially valid in two instances: when the overall diversity is low and when the targeted communities live in the same habitat. One last important issue is the validation of the 454 sequencing-based phylogenomic results, using complementary methods such as microarrays, quantitative PCR, and cultivation-dependent approaches. In the present study, our phylogenomic results on the structure of the mineral-associated bacterial communities characterized by a low genetic diversity were obtained by pyrosequencing from a single pyrosequencing run. The results of the present study confirm and extend previous results obtained by cloning and Sanger sequencing of the 16S rRNA from the bacteria on the same minerals at the same forest experimental site (54).

The culture approach revealed that the bacterial isolates collected under the Douglas fir (mean value, $0.56 \pm 0.10 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ of iron released) and Corsican pine (mean value, $0.46 \pm 0.10 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ of iron released) stands were significantly more efficient at weathering ($P = 0.0001$) than those from the other environments (see Fig. S3 in the supplemental material). In addition, the apatite surfaces below Douglas fir and Corsican pine harbored a significantly higher frequency of the most efficient mineral-weathering bacterial isolates ($\geq 0.5 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ of iron released) than the other stands, according to a χ^2 analysis ($P = 0.0069$) (see Fig. S3 in the supplemental material). Taxonomic assignments of these isolates revealed sequences related to genera exhibiting high similarity with the 16S rRNA sequences generated by pyrosequencing in this study. A comparison of the mineral-weathering efficacies measured for each bacterial genus showed that the *Burkholderia* strains were the most efficient at weathering minerals (average value: $0.93 \pm 0.14 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ Fe released), according to a one-factor (genus) ANOVA ($P = 0.0001$) (Fig. 3). The most efficient strain of *Burkholderia* (strain PA10) presented an *in vitro* mineral-weathering efficacy of $1.51 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ Fe released from biotite. The other genera presented values ranging from 0 (for *Cohnella* and *Cytophaga*) to 0.95 (for *Arthrobacter*) $\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ Fe released. Detailed analysis of the metabolic capability of the mineralosphere bacterial isolates in relation to their ecological origin (tree stand) revealed a very limited number of substrates metabolized and significant differences among the substrates metabolized by the mineralosphere bacteria below each tree stand (see Fig. S4 in the supplemental material). Our Biolog data indicated that there was no

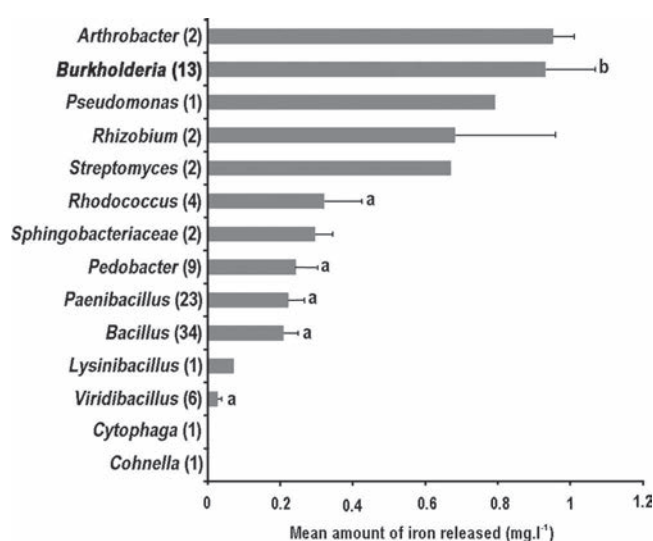


FIG 3 Relationships between the mean amount of iron released and the genus level classification of the bacterial strains. A total of 100 bacterial isolates were identified based on their 16S rRNA gene sequences and tested for their ability to weather minerals. The numbers of bacterial strains isolated per genus are in parentheses. For the genera with a minimum of three bacterial strains identified, a one-factor (genus) ANOVA was performed ($P = 0.0001$). Bars associated with the same letters are not significantly different.

significant difference in α -D-glucose consumption between the different tree stands (one-factor ANOVA [tree species]; $P = 0.12$) but that there were differences between the different bacterial genera. The bacterial isolates belonging to the *Burkholderia* genus consumed significantly more α -D-glucose (one-factor ANOVA [genus]; $P = 0.0001$).

In conclusion, this study demonstrates for the first time, by combining cultivation-dependent and -independent approaches, that mineral surfaces in forest soils are colonized by specific bacterial communities capable of mineral weathering, thus confirming the mineralosphere concept (51). In this view, although there may remain some uncertainty about their exact proportion on the mineral, there is little doubt that betaproteobacteria, and especially bacteria from the genus *Burkholderia*, are key players in the weathering of minerals and nutrient cycling in temperate forest soils.

Accession numbers. The 454 sequences generated have been deposited on MG-RAST under the following accession numbers: 4445487.3, coppice with standards; 4445488.3, Corsican pine; 4445489.3, Norway spruce; 4445491.3, beech; 4445490.3, Douglas fir; and 4445492.3, bulk soil. The sequences of the bacterial isolates have been deposited in the GenBank database under accession numbers JN819556 to JN819658.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was made possible by grants from French Research Ministry (ANR JC BACTOWEATHER and ACI quantitative ecology project) and EC2CO Ecosphère continentale et côtière program. C. Lepleux is a Ph.D. student supported by a fellowship from the Lorraine Region and INRA (Département EFPA).

We thank J. Ranger, L. Mareschal, A. Cébron, P. Simonet, S. Vuilleumier, and L. C. Kelly for helpful discussions and B. Simon for technical assistance.

REFERENCES

- Augusto L, Turpault M-P, Ranger J. 2000. Impact of forest tree species on feldspar weathering rates. *Geoderma* 96:215–237.
- Badeau V, Dambrine E, Walter C. 1999. Propriétés des sols forestiers français: résultats du premier inventaire systématique. *Etude Gest. Sols* 6:165–180.
- Balland C, Poswa A, Leyval C, Mustin C. 2010. Dissolution rates of phyllosilicates as a function of bacterial metabolic diversity. *Geochim. Cosmochim. Acta* 74:5478–5493.
- Reference deleted.
- Bennett PC, Hiebert FK, Choi WJ. 1996. Microbial colonization and weathering of silicates in a petroleum-contaminated groundwater. *Chem. Geol.* 132:45–53.
- Berry D, Ben Mahfoudh K, Wagner M, Loy A. 2011. Barcoded primers used in multiplex amplicon pyrosequencing bias amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:7846–7849.
- Borin S, et al. 2010. Rock weathering creates oases of life in a high Arctic desert. *Environ. Microbiol.* 12:293–303.
- Boyd ES, Cummings DE, Geesey GG. 2007. Mineralogy influences structure and diversity of bacterial communities associated with geological substrata in a pristine aquifer. *Microb. Ecol.* 54:170–182.
- Calvaruso C, Turpault M-P, Frey-Klett P. 2006. Root-associated bacteria contribute to mineral weathering and to mineral nutrition in trees: a budgeting analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:1258–1266.
- Calvaruso C, Turpault M-P, et al. 2010. Forest trees influence distribution of the mineral weathering bacterial communities from the scleroderma citrinum mycorrhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:4780–4787.
- Carson JK, Rooney D, Gleeson DB, Clipson N. 2007. Altering the mineral composition of soil causes a shift in microbial community structure. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61:414–423.
- Carson JK, Campbell L, Rooney D, Clipson N, Gleeson DB. 2009. Minerals in soil select distinct bacterial communities in their microhabitats. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67:381–388.
- Certini G, Campbell CD, Edwards AC. 2004. Rock fragments in soil support a different microbial community from the fine earth. *Soil Biol. Biochem.* 36:119–1128.
- Cockell CS, Olsson K, Herrera A, Meunier A. 2009. Alteration textures in terrestrial volcanic glass and the associated bacterial community. *Geobiology* 7:50–65.
- Collignon C, Uroz S, Turpault M-P, Frey-Klett P. 2011. Seasons differently impact the structure of mineral weathering bacterial communities in beech and spruce stands. *Soil Biol. Biochem.* 43:2012–2022.
- Droege M, Hill B. 2008. The genome sequencer FLX™ system—longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets. *J. Biotechnol.* 136:3–10.
- Edwards U, Rogall T, Blocker H, Emde M, Bottger EC. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterisation of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 17:7843–7853.
- Engelbrektson A, et al. 2010. Experimental factors affecting PCR-based estimates of microbial species richness and evenness. *ISME J.* 4:642–647.
- Frey B, et al. 2010. Weathering-associated bacteria from the Damma glacier forefield: physiological capabilities and impact on granite dissolution. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:4788–4796.
- Gadd GM. 2007. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol. Res.* 3:3–49.
- Gleeson D, McDermott F, Clipson N. 2006. Structural diversity of bacterial communities in a heavy metal mineralized granite outcrop. *Environ. Microbiol.* 8:383–393.
- Gomez-Alvarez V, Teal TK, Schmidt TM. 2009. Systematic artifacts in metagenomes from complex microbial communities. *ISME J.* 3:1314–1317.
- Herrera A, et al. 2008. Bacterial colonization and weathering of terrestrial obsidian in Iceland. *Geomicrobiol. J.* 25:25–37.
- Hutchens E. 2009. Microbial selectivity on mineral surfaces, possible implications for weathering processes. *Fungal Biol. Rev.* 23:115–121.
- Hutchens E, Gleeson D, McDermott F, Miranda-CasoLuengo R, Clipson N. 2010. Meter-scale diversity of microbial communities on a weathered pegmatite granite outcrop in the Wicklow Mountains, Ireland: evidence for mineral induced selection? *Geomicrobiol. J.* 27:1–14.
- Jacobson AD, Wu L. 2009. Microbial dissolution of calcite at T = 28°C and ambient pCO₂. *Geochim. Cosmochim. Acta* 73:2314–2331.
- Kelly LC, et al. 2010. Bacterial diversity of weathered terrestrial Icelandic volcanic glasses. *Microb. Ecol.* 60:740–752.
- Kunin V, Engelbrektson A, Ochman H, Hugenholtz P. 2010. Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environ. Microbiol.* 12:118–123.
- Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p 115–176. *In* Stackebrandt E, Goodfellow M (ed), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom.
- Lapanje A, Wimmersberger C, Furrer G, Brunner I, Frey B. 2012. Pattern of elemental release during granite dissolution can be changed by aerobic heterotrophic bacterial strains isolated from Damma glacier (central Alps) deglaciated granite sand. *Microb. Ecol.* 63:865–882.
- Leveau JHJ, Uroz S, de Boer W. 2010. The bacterial genus *Collimonas*: mycophagy, weathering and other adaptive solutions to life in oligotrophic soil environments. *Environ. Microbiol.* 12:281–292.
- Leyval C, Berthelin J. 1991. Weathering of a mica by roots and rhizospheric micro-organisms of pine. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 55:1009–1016.
- Mailloux BJ, et al. 2009. Microbial mineral weathering for nutrient acquisition releases arsenic. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:2558–2565.
- Mareschal L. 2008. Effet des substitutions d'essences forestières sur l'évolution des sols et de leur mineralogie. Ph.D. thesis. Université Nancy Henri Poincaré, Nancy, France.
- Mareschal L, Bonnaud P, Turpault M-P, Ranger J. 2010. Impact of common European tree species on the chemical and physicochemical properties of fine earth: an unusual pattern. *Eur. J. Soil. Sci.* 61:14–23.
- Marschner H. 1991. Mechanism of adaptation of plants to acid soils. *Plant Soil* 134:1–20.
- Meyer F, et al. 2008. The metagenomics RAST server—a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* 9:386. doi:10.1186/1471-2105-9-386.
- Park CY, Fenter P, Zhang Z, Cheng LW, Sturchio NC. 2004. Structure of fluoroapatite (100)-water interface by high-resolution X-ray reflectivity. *Am. Mineral.* 89:1647–1654.
- Puente ME, Bashan Y, Lebsky VK. 2004. Microbial populations and activities in the rhizosphere of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biol.* 6:629–642.
- Qi-Wang, Ma GY, He LY, Sheng XF. 2011. Characterization of bacterial community inhabiting the surfaces of weathered bricks of Nanjing Ming city walls. *Sci. Total Environ.* 409:756–762.
- Ranger J, et al. 2007. Effet de la substitution d'essence sur le fonctionnement et la durabilité des écosystèmes forestiers: l'apport des travaux pluridisciplinaires menés en forêt de Breuil Chenue-Morvan. *Rev. Sci. Bourgogne Nature Hors Série* 3:91–114.
- Reference deleted.
- Rogers JR, Bennett PC. 2004. Mineral stimulation of subsurface microorganisms: release of limiting nutrients from silicates. *Chem. Geol.* 203:91–108.
- Santelli CM, Edgcomb VP, Bach W, Edwards C. 2009. The diversity and abundance of bacteria inhabiting seafloor lavas positively correlate with rock alteration. *Environ. Microbiol.* 11:86–98.
- Schloss PD, et al. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:7537–7541.
- Song W, Ogawa N, Oguchi CT, Hatta T, Matsukura Y. 2007. Effect of *Bacillus subtilis* on granite weathering: a laboratory experiment. *Catena* 70:275–281.
- Suzuki MT, Giovannoni SJ. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:625–630.
- Turpault M-P, Nys C, Calvaruso C. 2009. Rhizosphere impact on the dissolution of test minerals in a forest ecosystem. *Geoderma* 153:147–154.
- Uroz S, et al. 2007. Effect of the mycorrhizosphere on the genotypic and metabolic diversity of the bacterial communities involved in mineral weathering in a forest soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:3019–3027.
- Uroz S, et al. 2009. Efficient mineral weathering is a distinctive functional trait of the bacterial genus *Collimonas*. *Soil Biol. Biochem.* 41:2178–2186.
- Uroz S, Calvaruso C, Turpault M-P, Frey-Klett P. 2009. The microbial weathering of soil minerals, ecology, actors and mechanisms. *Trends Microbiol.* 17:378–387.

52. Uroz S, Buée M, Murat C, Frey-Klett P, Martin F. 2010. Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil. *Environ. Microbiol. Rep.* 2:281–288.
53. Uroz S, et al. 2011. Bacterial weathering and its contribution to nutrient cycling in temperate forest ecosystems. *Res. Microbiol.* 162:820–831.
54. Uroz S, et al. 2012. Minerals affect the specific diversity of forest soil bacterial communities. *Geomicrobiol. J.* 29:88–98.
55. Uroz S, Oger PM, Morin E, Frey-Klett P. 2012. Distinct ectomycorrhizospheres share similar bacterial communities as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:3020–3024.
56. Wu L, Jacobson AD, Hausner M. 2008. Characterization of elemental release microbe-basalt interactions at T=28°C. *Geochim. Cosmochim. Acta* 71:2224–2239.
57. Wu L, Jacobson AD, Hausner M. 2008. Characterization of elemental release microbe-granite interactions at T=28°C. *Geochim. Cosmochim. Acta* 72:1076–1095.
58. Zhou JZ, Kang S, Schadt CW, Garten CT. 2008. Spatial scaling of functional gene diversity across various microbial taxa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:7768–7773.
59. Zhou J, et al. 2011. Reproducibility and quantitation of amplicon sequencing-based detection. *ISME J.* 5:1303–1313.

Supplemental data

Materials and methods

Study site

The Breuil-Chenué experimental site (40) is located in the Morvan (47°18'N, 4°5'E, France), on a plateau with an altitude of 630 m. The native forest was partially clear-felled and replaced in 1976 by monospecific tree plantations distributed in plots of 0.1 ha of different species such as beech (*Fagus sylvatica*), Norway spruce (*Picea abies*), Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* Franco), Corsican pine (*Pinus nigra* Arn. ssp. *laricio* Poiret var. *Corsicana*) and coppice-with-standards (CwS). The 'coppice-with-standards' is a specific woodland management practice whereby some trees are felled while others are left (here beech) to grow as larger sized timber, named 'standards'. The soil is an Allocrisol, developed on the "Pierre qui Vire" granite. The bulk soil is sandy-loam textured (60% sands and <20% clays) and acidic (pH ca 4) (36). This granite is characterized by quartz, K-feldspar, plagioclase (albite), muscovite, biotite, chlorite and accessory minerals (apatite, zircon) (29). Soil characteristics from each tree stand are presented in Table 1.

Minerals and sampling

To investigate the bacterial communities colonizing and weathering minerals, we selected apatite, which is one of the main accessory mineral encountered in the Breuil-Chenué soil. The apatite used in our study is a pure and homogenous fluoroapatite from Mexico and has the following composition: 1.8 g.kg⁻¹ SiO₂, 0.5 g.kg⁻¹ Al₂O₃, 0.8 g.kg⁻¹ Fe₂O₃, 546.1 g.kg⁻¹ CaO, 0.4 g.kg⁻¹ MgO, 2.7 g.kg⁻¹ Na₂O, 0.1 g.kg⁻¹ MnO and 410.3 g.kg⁻¹ P₂O₅ (44). Its structural formula is (Ca_{9.77} La_{0.03} Ce_{0.04} Sr_{0.007} Fe_{0.003} Si_{0.06}) (P_{1.02} O₄)₆ F_{2.08} Cl_{0.12}) (34). Pure crystals of apatite (initial size ca 2 cm) were ground, sonicated, washed and calibrated (mesh size 0.5-1mm; 1.9±0.3 mg/particle). Three grams, corresponding to ca 1600 particles, were introduced into nylon bags (mesh size 50 μm; 4x10 cm) to prevent root colonization. Five replicates bags each were buried under five tree stands (beech, Norway spruce, Douglas fir, Corsican pine, and in the coppice-with-standards), within the soil organo-mineral layer (-10 cm), with ca. 5 m distance between each bag sample. Mineral bags were incubated *in situ* for four years in the soil before sampling. Because of protocol incompatibility, four of the five bags from each condition were used to quantify apatite dissolution, while the remaining bag was used to characterize microbial colonization. Indeed the protocol used to measure the percentage of dissolution, which is based on an ultrasonic treatment, results in the degradation of genomic DNA and the protocol used to extract genomic DNA disrupts the mineral particles. Preliminary analyses on bulk soil samples by 454 pyrosequencing and temperature gradient gel electrophoresis fingerprinting (TTGE; Figure S1) revealed a low heterogeneity of bulk soil bacterial communities at the Breuil-Chenué site (51). For these reasons, a composite bulk

soil (TBS) sample was generated. In our study, bulk soil sample (TBS) corresponded to a combined mixture of soils, free of roots, taken from all the stands where the mineral bags were incubated.

Mineral weathering measurements

After four years, the incubated minerals were washed with ultrapure water directly in the mesh bags to avoid losing mineral particles, sonicated using a MiniPiezon (EMS+) system (50Hz) to remove soil particles and dried at 35°C. After the drying step, mineral particles were carefully recovered from the mesh bags and weighed (accuracy 0.0005 g) using the specific procedure described in Augusto *et al.* (1) and compared to the initial weight values obtained before incubation (47). This procedure allows the determination of the dissolution level of these minerals. The dissolution intensity was expressed as the percentage of weight reduction measured over the four-year incubation period. The surfaces of the recovered minerals were subsequently observed directly by scanning electron microscopy (Hitachi S2500).

DNA extraction, PCR and pyrosequencing

Genomic DNA (gDNA) was extracted from 250 mg of apatite particles or from the surrounding bulk soil using the PowerSoil DNA kit from MoBio with the addition of proteinase K (50 g.l⁻¹) and lysozyme (10 g.l⁻¹) in the first step. For the apatite samples, two independent samples collected at the opposite corners of the same bag were treated for each condition considered. gDNA was quantified on 1% agarose gel by comparison with a low DNA mass ladder from Invitrogen®. Amplicon libraries were generated as recommended for 454 pyrosequencing using a combination of two tagged primers, targeting the V5 and V6 variable regions of the 16S rRNA gene. The Titanium primers used were 787r-Ti (5'-BxxxATTAGATACCYTGTAGTCC3') and 1073F-Ti (5'-AxxxACGAGCTGACGACARCCATG3') to generate PCR 16S rRNA gene fragments of ca 250 bp. B and A represents the linkers (CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG) and (CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG) recommended by the manufacturer for 454 FLX Titanium sequencing, and xxx represents the sample identification barcoding key. PCR was performed in two steps using 50 ng of gDNA as template. The cycling conditions used were 94°C for 4min, 20 cycles of 94°C, 30 s denaturation; 50°C, 1 min annealing and 72°C, 1 min 30 s extension; followed by 72°C, 10 min. After 20 rounds of amplification, another 10 rounds of amplification were performed to add the A and B adapters required for 454 pyrosequencing to specific ends of the amplified 16S rRNA gene fragment for library construction. Ten separate amplification reactions of 50 µl for each sample were pooled and purified as recommended using QIAquick PCR purification columns (Qiagen). The amplicon length and concentrations were estimated and an equimolar mix of all six amplicon libraries was used for pyrosequencing.

Pyrosequencing was performed by Beckman Coulter Genomics (Beverly, USA) on a Genome Sequencer (GS) FLX 454 Titanium System (Roche) and resulted in reads which passed the length and quality criteria (16).

Taxonomic analysis of 16S rRNA gene fragments

Before alignment, sequences sets were trimmed, cleaned and denoised to conserve sequences ranging from 250 to 300 bp using the trim.seq command of MOTHUR (44) and then treated with the command “unique” of MOTHUR to eliminate sequences duplicates. Unique phylotypes were defined as having a final 16S rRNA gene sequence similarity of 97% with the other sequences in the libraries, using the greengenes reference alignment, according to Schloss *et al.* (44). The aligned sequences were used to determine operational taxonomic units (OTUs, 97 % sequence similarity), richness estimates Chao1, Shannon-Weaver index and rarefaction analyses. Taxonomic affiliation was performed (80% sequence similarity) using MG-RAST (Metagenome Rapid Annotation using Subsystem Technology) (37).

Isolation of bacterial isolates from apatite samples

For each tree stand, a total of 40 bacterial isolates were obtained from apatite surfaces as follows: 200 mg of apatite particles were suspended in 1 ml sterile MQ water and vortexed for 1 min. These suspensions were then sampled and used to perform serial dilutions. Dilutions were then spread onto 10% tryptic soy agar (TSA) medium (3 g.l⁻¹ Tryptic Soy Broth, from Difco and 15 g.l⁻¹ agar) and incubated at 25°C for 7 days. For each sample, the bacterial isolates were picked up randomly from the same dilution. They were purified by three successive platings on 10% TSA and then stored at - 80°C in Luria-Bertani (LB) medium + 20% glycerol.

Mineral weathering assay

The mineral weathering potential of the bacteria isolated from mineral surfaces was quantified as described in Uroz *et al.* (48). The mineral weathering assay used is based on the measurement of the amount of protons produced during the bacteria-mineral interaction, as well as on the amount of cations released from the mineral. Biotite was used here instead of apatite as it was previously demonstrated that the same mineral weathering bacterial strains efficiently weather a variety of minerals (2,22,49,50). Briefly, 20µl of bacterial inoculum ($A_{595nm}=0.8-1$) were transferred into a well of a sterile Multiscreen microplate (MSGVN22-50; 0.22 µm pore size; Millipore) containing 10 mg of sterile biotite particles (diameter, 200 to 500 µm, which was convenient for the experimental procedure used) and 180 µl of Bushnell-Hass medium. [20 mg.l⁻¹ KCl, 150 mg.l⁻¹ MgSO₄· 7H₂O, 80 mg.l⁻¹ NaH₂PO₄·2H₂O, 90 mg.l⁻¹ Na₂HPO₄·2H₂O, 65 mg.l⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 100 mg.l⁻¹ KNO₃, 20 mg.l⁻¹ CaCl₂] which was buffered at pH 6.5,

supplemented with glucose (2 g.l⁻¹) and lacked iron. The biotite was obtained from Bancroft (Canada) and was a 2:1 phyllosilicate frequently present in acidic soil, weathers relatively quickly, and contains K, Mg, and Fe nutrients. It is a pure homogeneous mineral of the following composition: 410.1 g.kg⁻¹ SiO₂, 109 g.kg⁻¹ Al₂O₃, 22.1 g.kg⁻¹ Fe₂O₃, 100.5 g.kg⁻¹ FeO, 2.7 g.kg⁻¹ MnO, 189 g.kg⁻¹ MgO, 4.1 g.kg⁻¹ Na₂O, 94.6 g.kg⁻¹ K₂O, 22.8 g.kg⁻¹ TiO₂, 44.2 g.kg⁻¹ F, and 0.8 g.kg⁻¹ Zn. Its structural formula is (Si₃Al₁)(Fe³⁺_{0.12}Fe²⁺_{0.61}Mg_{2.06}Mn_{0.02}Ti_{0.13}) K_{0.88}Na_{0.06}O₁₀(OH_{0.98}F_{1.02})(9). Multiscreen microplates containing 10 mg of biotite particles were sterilized by UV treatment for one hour before filling with sterile liquid media. Each bacterial strain was inoculated in 8 wells of the microplates: 4 were used to determine the pH and 4 were used to determine the amount of iron released from biotite. Two *Burkholderia* strains, PN3(3) and PML1(12), were used as negative and positive controls, respectively. The Multiscreen microplates were incubated at 25°C for 48 h with constant shaking. MultiScreen microplates were centrifuged and filtrates (0.22 µm) were transferred to a new microplate containing 20 ml of ferrospectral[®] (Merck, for iron quantification) or bromocresol green (1 g.l⁻¹, Sigma, for pH determination). The amount of total iron (Fe²⁺ and Fe³⁺) released from biotite in the solution and the pH were estimated at 595 nm with a Bio-Rad model 550 microplate reader. The average values of the four replicates for iron quantification and for pH measurements were taken as the weathering potential of each bacterial isolate.

PCR amplification of the 16S rRNA gene from the bacterial isolates

The 16S rRNA gene amplification was performed using the universal primers pA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 907r (5'-CCGTCAATTCMTTGGAGTTT-3')(17,29). Polymerase chain reactions were performed in a total reaction volume of 50 µl containing 1x PCR Mastermix (Eppendorf[®]), 0.1 µM primers and 1 µl of cell extract. Cell extract was prepared by adding one colony of each isolate to 100 µl of sterile water. The following temperature cycle was used: an initial denaturation step of 5 min at 95°C followed by 30 cycles of 1 min denaturation at 95°C, 1 min annealing at 53°C and 1 min 30 s extension at 72°C, and a final extension step of 10 min at 72°C. PCR products were purified and concentrated using the microtitre plate PCR purification system (Millipore). PCR controls with no template or extraction controls as a template were negative.

Metabolic assay

The ability of the bacterial isolates coming from apatite surfaces to use sole carbon sources was tested using the BIOLOG[®] GEN III MicroPlates. The bacterial isolates were grown on 10% TSA plates at 25°C. After a 3-day incubation (25°C), bacterial suspensions were made by adding 2 ml of sterile water to the Petri dish. The bacterial suspensions were then washed three times with sterile ultrapure water. The absorbance at 595 nm of each resulting suspension was then adjusted ca. 0.3. One hundred microliters

of these suspensions were used to inoculate the microplates. Optical density was measured after 48 h incubation at 25°C at 595 nm with an automatic microplate reader (Bio-Rad model 550).

Statistical analyses

The different relative values (%) used in this study were transformed by arcsin sqrt for statistical and linear regression analyses. The effects of the tree stand on the mineral dissolution were determined by analysis of variance (ANOVA) at a threshold level of $P=0.05$ and by the Fischer test using the Superanova software (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA). The proportion of bacterial isolates per functional class, differing in their ability to acidify the medium or to release iron from biotite, were compared between the different origins of the isolates using a χ^2 test ($P=0.05$). The correlation between mineral dissolution and taxonomic classification or bacterial diversity was analysed by performing a linear regression analysis at a threshold level of $P=0,05$ with the Statview software (SAS Institute, Cary, NC).

Nucleotide sequence accession numbers. The 454 sequences generated have been deposited on MG-RAST (MG-RAST ID : 4445487.3, coppice-with-standards ; 4445488.3, Corsican pine ; 4445489.3, Norway spruce ; 4445491.3, beech ; 4445490.3, Douglas fir and 4445492.3, Bulk soil) and the sequences of the bacterial isolates have been deposited in the GenBank database under accession numbers JN819556-JN819658.

Table S1: Soil characteristics below the different tree stands in the organo-mineral soil horizon, adapted from Mareschal et al.,(31,32). For each tree stand different letters (a,b) indicate significant differences according to a t-test ($p < 0.05$).

Environment	pH	g. kg ⁻¹				% of total CEC ²		
		C	N	P	K	Mg	Ca	EA ¹
Coppice with standards	4.33 ^b	46 ^b	2.6 ^a	0.14 ^a	3.8 ^b	1.9 ^b	1.4 ^b	87.3 ^a
Beech	4.06 ^a	50 ^b	2.6 ^a	0.15 ^{ab}	3.7 ^b	1.8 ^{ab}	1.9 ^b	85.8 ^a
Douglas	4.25 ^b	43 ^b	2.4 ^a	0.14 ^a	3.3 ^{ab}	1.8 ^a	0.9 ^a	91.6 ^b
Corsican pine	4.22 ^b	43 ^b	2.1 ^a	0.13 ^a	2.3 ^a	1.8 ^{ab}	1.3 ^{ab}	92.0 ^b
Norway spruce	4.36 ^b	37 ^a	2.4 ^a	0.16 ^b	3.2 ^{ab}	1.8 ^{ab}	1.1 ^a	91.7 ^b

¹ EA : Exchangeable acidity

² CEC : Cationic exchange capacity

Table S2: Number of sequences, number of OTUs and diversity and richness indices of bacterial communities on apatite surfaces under the different environments considered. Analyses were performed at 97% sequence similarity.

Tree stand	Number of Reads	OTUs (97%)	OTUs 97% normalized with Beech*	Shannon	Chao1 (Lower and upper 95% confidence intervals)	ACE (Lower and upper 95% confidence intervals)
Beech	31 666	10 071	10 071	7.88	26 597 (\pm 25 460.26 / 27 817.63)	48 158 (\pm 47 446.01 / 48 882.96)
Norway spruce	35 115	9 012	8 329	7.47	20 589 (\pm 19 656.46 / 21 599.23)	35 484 (\pm 34 939.49 / 36 038.79)
Corsican pine	46 070	4 932	3 798	5.91	8 168 (\pm 7 668.31 / 8 732.70)	12 334 (\pm 12 074.71 / 12 600.47)
Coppice with standards	35 492	9 899	9 055	7.49	24 311 (\pm 23 198.66 / 25 511.67)	43 863 (\pm 43 183.52 / 44 556.71)
Douglas fir	36 829	10 899	9 682	7.82	26 461 (\pm 25 267.44 / 27 745.25)	48 655 (\pm 47 947.33 / 49 375.73)
Bulk soil	33 549	14 213	13 557	8.53	41 707 (\pm 40 025.33 / 43 494.64)	85 209 (\pm 84 007.88 / 86 430.10)

* The number of OTUs was normalized according to the smallest set of sequences (beech) using the 'subsample' command of Mothur.

Table S3 : Relative abundance of ten most abundant genera. Analyses were performed at a 95% sequence similarity threshold and calculated with the MG-RAST platform.

Bulk soil		Beech		Douglas fir		Coppice with standards		Norway spruce		Corsican pine		
Genus	% ^a	Genus	% ^a	Genus	% ^a	Genus	% ^a	Genus	% ^a	Genus	% ^a	
1	Unclassified bacteria	12.97	<i>Burkholderia</i>	18.25	<i>Burkholderia</i>	12.76	<i>Oxalobacteraceae</i> ^c	16.11	<i>Burkholderia</i>	37.63	<i>Burkholderia</i>	34.68
2	<i>Acidobacterium</i>	6.38	<i>Pedobacter</i>	7.72	<i>Pedobacter</i>	4.49	<i>Burkholderia</i>	13.83	<i>Acidobacterium</i>	6.25	<i>Pedobacter</i>	16.39
3	γ -proteobacteria ^b	6.26	<i>Chitinophaga</i>	5.08	<i>Acidobacterium</i>	2.82	<i>Oxalobacteraceae</i> ^b	8.99	<i>Pedobacter</i>	8.54	<i>Chitinophaga</i>	12.62
4	<i>Rhodoplanes</i>	4.90	<i>Oxalobacteraceae</i> ^b	4.91	γ -proteobacteria ^b	2.51	<i>Acidobacterium</i>	6.65	<i>Chitinophaga</i>	4.10	<i>Oxalobacteraceae</i> ^b	9.28
5	<i>Gemmatimonas</i>	3.23	<i>Acidobacterium</i>	4.29	Unclassified bacteria	2.41	<i>Chitinophaga</i>	2.83	<i>Streptomyces</i>	3.33	<i>Streptomyces</i>	3.51
6	<i>Rhizobiales</i> ^b	3.04	<i>Alterococcus</i>	3.65	<i>Curtobacterium</i>	2.37	γ -proteobacteria ^b	2.55	γ -proteobacteria ^b	2.49	<i>Paenibacillus</i>	1.40
7	α -proteobacteria ^b	2.86	<i>Xanthomonadaceae</i> ^b	3.06	<i>Sphingobacteriaceae</i> ^b	2.08	<i>Burkholderiales</i> ^b	2.22	<i>Bradyrhizobiaceae</i> ^b	2.45	<i>Burkholderiales</i> ^b	1.14
8	<i>Bradyrhizobium</i>	2.72	γ -proteobacteria ^b	2.98	<i>Bradyrhizobiaceae</i> ^b	1.95	Unclassified bacteria	2.19	<i>Rhizobiales</i> ^b	1.62	<i>Herbaspirillum</i>	0.94
9	<i>Alterococcus</i>	2.80	<i>Bradyrhizobiaceae</i> ^b	2.94	Proteobacteria ^b	1.42	Proteobacteria ^b	2.05	Proteobacteria ^b	1.45	<i>Curtobacterium</i>	0.89
10	<i>Pedobacter</i>	1.96	<i>Curtobacterium</i>	2.32	<i>Bradyrhizobium</i>	1.36	<i>Streptomyces</i>	1.98	<i>Oxalobacteraceae</i> ^b	1.34	<i>Pandoraea</i>	0.80

^aRelative abundance

^bUnclassified genus

^cSequences matches with several genera belonging to the family Oxalobacteraceae (*Herbaspirillum*, *Janthinobacterium* and *Collimonas*).

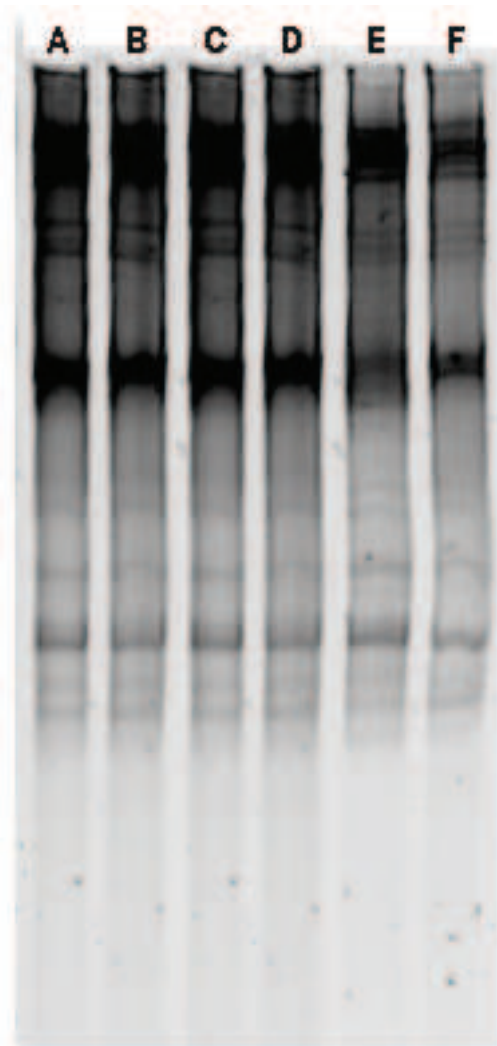


Figure S1 : TTGE band patterns of 16S rRNA gene PCR products amplified from the bulk soil of the Breuil-Chenue experimental site, below A) Coppice with standards, B) Norway spruce, C) Beech, D) Corsican pine E) Douglas and F) Oak using the primers 968F-GC and 1401R as described in Cébron *et al.*, 2009.

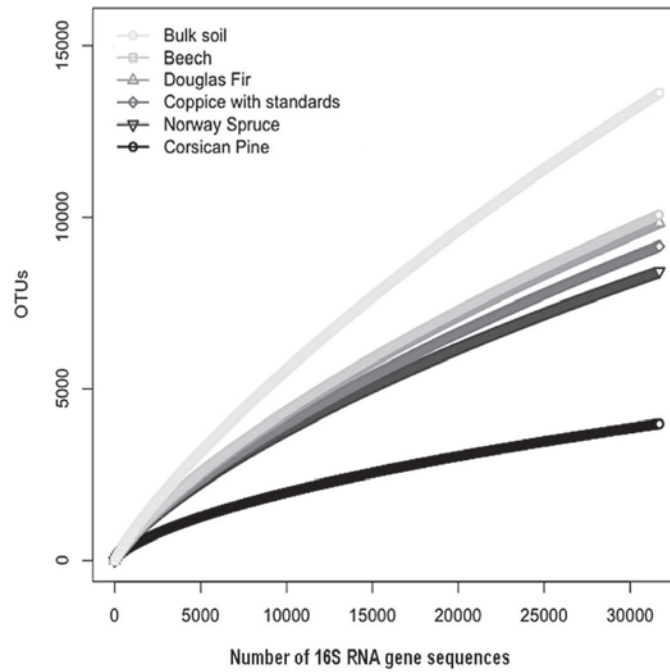


Figure S2: Rarefaction curves. The rarefaction curves of the bacterial 16S rRNA gene sequences, recovered from the apatite particles sampled in the different tree stands considered in this study, were created using the MOTHUR software for generating data and the R software for generating graphics (threshold 97%).

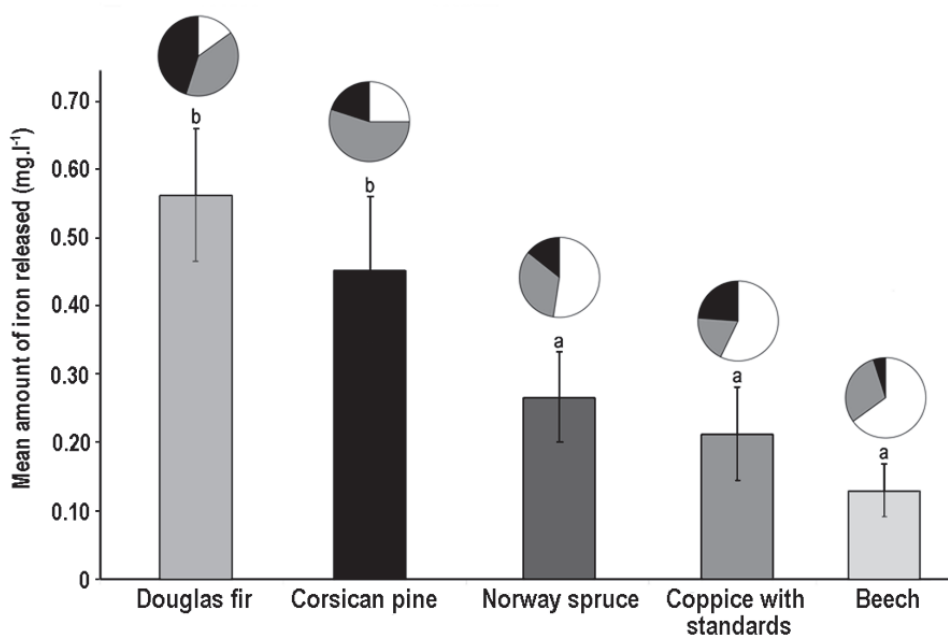


Figure S3: Mean amount of iron released by cultured mineralosphere bacterial strains. Bars associated with the same letter are not significantly different according to a one factor (tree species) ANOVA test ($P=0.0001$). The pie chart represents the distribution of the 100 bacterial isolates belonging to three different weathering classes: White, 0-0.1 mg.l⁻¹ of iron released ; Grey, 0.1-0.5 mg.l⁻¹ ; Black, >0.5 mg.l⁻¹. These classes have been determined according to statistical requirements, to avoid classes with no bacterial isolates (0). The frequency of efficient mineral weathering bacteria was higher below Douglas fir and Corsican pine, according to a χ^2 test ($P=0.0069$). The proportions of bacterial isolates per functional class, differing in their ability to acidify the medium or to release iron from biotite, were compared between the different origins of the isolates using a χ^2 test ($P=0.05$).

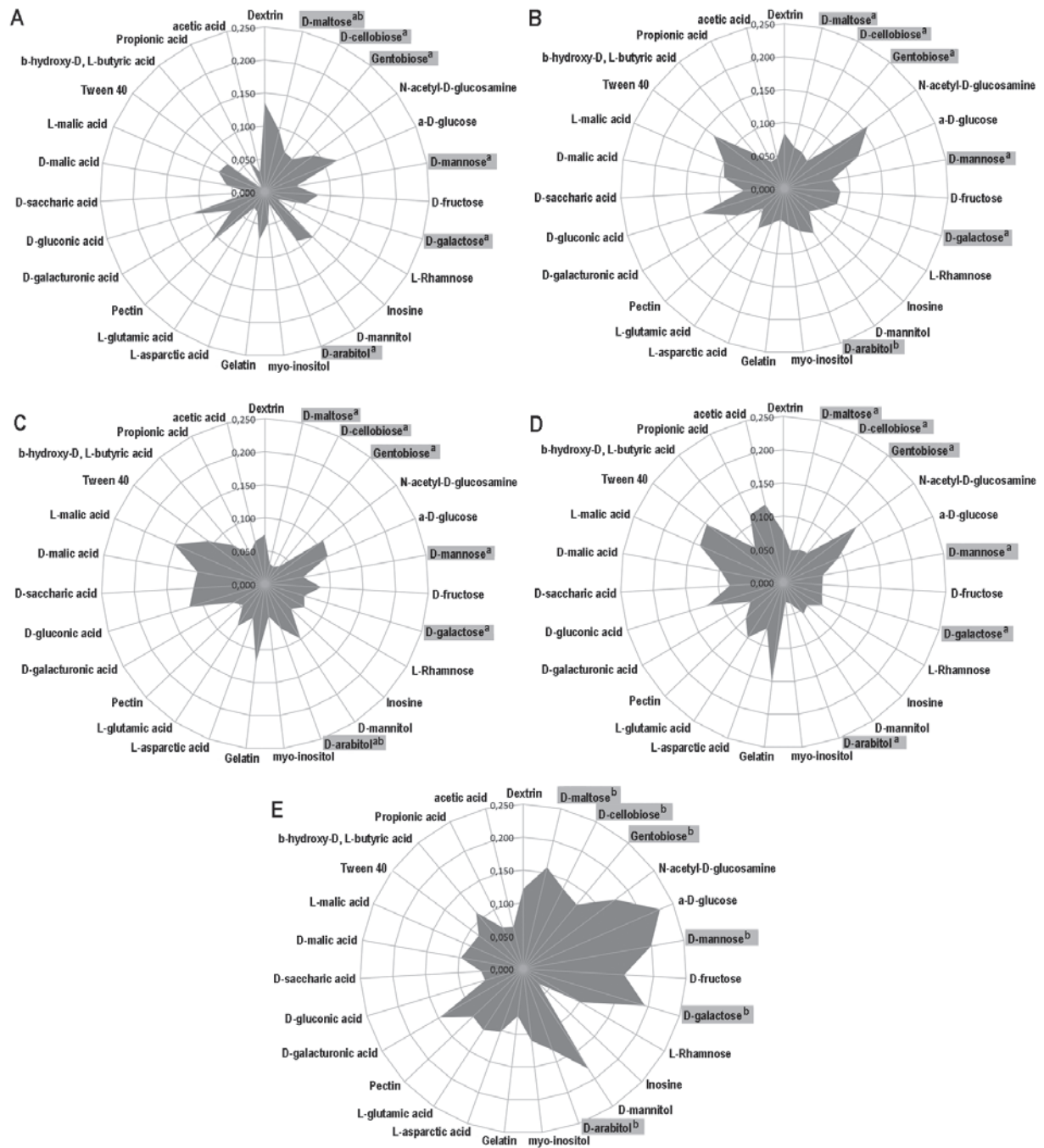


Figure S4: Carbon sources metabolized by the mineralosphere bacterial strains in relation with their ecological origin (A. Beech, B. Douglas fir, C. coppice-with-standards, D. Norway spruce and E. Corsican pine). Only carbon sources resulting in an optical density ≥ 0.1 were considered. According to a one factor ANOVA (tree stand), 6 of these 27 carbon sources presented significant differences: D-Maltose ($P=0.041$), D-Cellobiose ($P=0.033$), Gentobiose ($P=0.010$), D-Mannose ($P=0.004$), D-Galactose ($P=0.003$) and D-Arabitol ($P=0.032$). For each of these substrate, different letters (a, b) indicate a significant difference between the tree stands, according to a one factor ANOVA ($P<0.05$).

6. Discussion générale

L'article "Abundance of Betaproteobacteria on mineral surfaces correlates with mineral weathering in forest soils" ne discutant que brièvement les résultats obtenus dans cette étude, je me propose ici de discuter les points qui n'ont pas été ou très peu abordés.

Comparé à la rhizosphère, à la mycorrhizosphère ou au sol nu, peu d'études se sont intéressées aux communautés bactériennes colonisant la surface des minéraux du sol (i.e. la minéralosphère) (Carson *et al.*, 2007, 2009 ; Certini *et al.*, 2004 ; Roesch *et al.*, 2007 ; Uroz *et al.*, 2010, 2012.). En combinant des analyses d'acides gras phospholipidiques (PLFA) et des analyses métaboliques, Certini *et al.* (2004) ont démontré que la surface de particules de grès présentait des communautés bactériennes spécifiques par rapport au sol environnant. De même, *via* une approche de clonage/séquençage, une diminution de la diversité bactérienne et un enrichissement en taxa spécifiques ont été observés à la surface de particules minérales (apatite, plagioclase, phlogopite) comparativement au sol environnant (Uroz *et al.*, 2012). Ces résultats se sont vus confirmés par des expériences en microcosmes (Carson *et al.*, 2007, 2009) qui ont révélé une colonisation des surfaces minérales par des communautés bactériennes spécifiques. Cependant, l'ensemble de ces travaux ne donnent qu'un aperçu limité de la diversité taxonomique des communautés bactériennes associées à la surface des minéraux. L'étude réalisée au cours de ma thèse a permis de décrire dans le détail les communautés bactériennes associées à la surface des minéraux *via* une approche de pyroséquençage. Les résultats originaux obtenus dans cette étude ont confirmé les observations précédentes en démontrant que les communautés bactériennes colonisant la minéralosphère étaient différentes de celles du sol environnant, enrichies en taxons spécifiques et d'une diversité moindre. La plus grande diversité a été observée dans le sol environnant se caractérisant par une forte abondance de séquences assignées aux α -*proteobacteria* et aux bactéries non classées ainsi qu'une faible proportion de β -*proteobacteria*. En revanche, et quelque soit le peuplement sous lequel elles ont été enterrées (origine écologique), les grains d'apatite étaient caractérisées par une forte proportion de séquences assignées aux β -*proteobacteria* et, plus précisément, aux genres *Burkholderia* et *Collimonas* connus pour leur capacité à altérer les minéraux (Calvaruso *et al.*, 2006 ; Leveau *et al.*, 2009 ; Uroz *et al.*, 2007, 2009 ; Collignon *et al.*, 2011).

Dans d'autres environnements que le sol, des communautés bactériennes minéralosphériques ont été décrites : sur des roches volcaniques, la croûte terrestre, des affleurements de granite ou

d'obsidienne, des monuments historiques (Borin *et al.*, 2009 ; Cockell *et al.*, 2009 ; Herrera *et al.*, 2008 ; Hutchens *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2011), des aquifères (Boyd *et al.*, 2007 ; Rogers et Bennett, 2004) ou dans des environnements océaniques (Santelli *et al.*, 2008). La plupart de ces études ont suggéré que la colonisation microbienne était influencée par la composition chimique des minéraux et plus précisément par leur contenu nutritif (Boyd *et al.*, 2007 ; Gleeson *et al.*, 2006 ; Hutchens *et al.*, 2010 ; Mailloux *et al.*, 2009) ou leur degré d'altération (Santelli *et al.*, 2008). En effet, Santelli *et al.*, (2008) ont par exemple constaté que l'abondance des bactéries était positivement corrélée avec le degré d'altération des minéraux, les roches basaltiques les plus anciennes et les plus altérées étant celles présentant la plus grande biomasse microbienne. Par ailleurs, Uroz *et al.* (2012) ont mis en évidence que les minéraux les plus altérés étaient caractérisés par la diversité bactérienne la plus faible et un enrichissement en taxons spécifiques. En utilisant une approche de pyroséquençage, j'ai démontré pour la première fois une corrélation positive et significative entre la dissolution des grains d'apatite et l'abondance à leur surface de séquences assignées aux *β -proteobacteria* ou aux *Burkholderiales*. Ces résultats confirment que les minéraux du sol sont colonisés par des communautés bactériennes spécifiques et soutiennent le concept de la minéralosphère (Uroz *et al.*, 2009). Cependant, les caractéristiques physiologiques et fonctionnelles de ces communautés sont inconnues et leur implication dans l'altération minérale reste une hypothèse liée à leur capacité à coloniser les minéraux.

A ce jour, peu d'études ont essayé de caractériser fonctionnellement les communautés bactériennes associées à la surface des minéraux en condition *in situ* (Frey *et al.*, 2010 ; Hutchens *et al.*, 2010 ; Lapanje *et al.*, 2012 ; Mailloux *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2011) et aucune n'a été faite sur les minéraux du sol. Etant donné l'absence de gènes connus impliqués dans l'altération minérale, l'approche cultivable reste essentielle et complémentaire aux analyses métagénomiques pour étudier les capacités fonctionnelles des isolats bactériens. Dans mon étude, une forte proportion d'isolats bactériens provenant de la surface de l'apatite a été assignée aux Firmicutes (45%) tandis que la plupart des autres isolats appartenaient principalement aux *β -proteobacteria* (13%). Un enrichissement en *β -proteobacteria* cultivables à la surface des minéraux a également été observé par Herrera *et al.* (2008) pour des échantillons d'obsidienne, suggérant un effet structurant du minéral sur ce groupe bactérien particulier. Cependant, les résultats de l'approche cultivable contrastent avec ceux obtenus par l'approche non-cultivable dans laquelle les Firmicutes sont peu représentés tandis que les *Proteobacteria* sont dominantes (Figure 2 de l'article). De plus, d'autres isolats bactériens ont été désignés comme appartenant au groupe des *Bacteroidetes/Chlorobi* dont les représentants sont généralement considérés comme peu cultivables. De même, Hutchens *et al.* (2010) ont mis en

BOX 2 : Profil métabolique des souches de la minéralosphère

Une caractérisation métabolique *via* la méthode BIOLOG® a été réalisée sur un sous échantillon (n=58) de la collection bactérienne isolée de la surface de l'apatite. Les détails de cette méthode sont présentés dans la partie « Material and Methods » dans la section « Supplemental data » de l'article « Abundance of Beta-Proteobacteria on mineral surfaces correlates with mineral weathering in forest soils ». Sur les 71 substrats testés, seulement 27 ont été métabolisés par les souches testées ($DO_{600} \geq 0,1$), les autres substrats ($DO_{600} < 0,1$) ont été considérés comme non métabolisés (Figure C). De façon générale, l' α -D-glucose, le N-acetyl-D-glucosamine, l'acide L-malique et l'acide D-gluconique étaient les quatre sources de carbones les plus métabolisées pour les souches bactériennes associées à la surface de l'apatite quelque soit l'essence forestière. L'analyse détaillée de la capacité métabolique de ces isolats en fonction de l'essence forestière sous laquelle a été enterrée l'apatite, a révélé quelques différences significatives (Figure S4 de l'article). Les bactéries isolées de la surface de l'apatite enterrée sous le pin Corse ont consommé significativement plus de D-maltose ($p=0,041$), de D-cellobiose ($p=0,033$), de Gentobiose ($p=0,01$), de D-mannose ($p=0,004$), de D-galactose ($p=0,003$) et de D-arabitol ($p=0,032$) que celles provenant de l'apatite enterrée sous les autres peuplements (en accord avec une analyse ANOVA à un facteur, $p < 0,05$).

Partant du fait que l' α -D-glucose est la seule source de carbone disponible dans les tests d'altération minérale en microplaque utilisés dans cette étude, la relation entre la capacité à métaboliser ce carbohydrate et l'origine écologique ou l'affiliation taxonomique des isolats bactériens a été étudiée. Les données ont montré qu'il n'y avait aucune différence significative dans la consommation de l' α -D-glucose entre les différentes origines écologiques des isolats (ANOVA à un facteur [essence forestière], $p=0,12$). Cependant, les isolats bactériens appartenant au genre *Burkholderia* métabolisaient significativement plus l' α -D-glucose que les autres genres bactériens (ANOVA à un facteur [genre bactérien], $p=0,0001$).

Les données obtenues pour les isolats provenant de la surface de l'apatite ont été comparées à des données obtenues pour des souches bactériennes provenant de la mycorrhizosphère de *Scleroderma citrinum* sous chêne, prélevées sur le même site expérimental (Figure C et D). La comparaison des deux profils métaboliques (Figure C) a montré que les souches isolées de la mycorrhizosphère métabolisaient significativement plus de sources de carbone à en juger par les mesures de DO_{600} . De plus, les souches isolées de la mycorrhizosphère métabolisaient significativement plus le Tween 40, le D-mannose, le myo-inositol et l'acide saccharique ($p < 0,0001$). Par ailleurs, une analyse plus détaillée des deux profils a confirmé que les souches de la mycorrhizosphère consommaient significativement plus de sources de carbone que celles provenant de la surface de l'apatite (ANOVA à un facteur [origine écologique], $p < 0,05$) (Figure D). Cependant, les souches associées à la surface de l'apatite consommaient significativement plus de N-acetyl-D-glucosamine, d' α -D-glucose, de D-fructose et de D-mannitol que les souches isolées de la mycorrhizosphère (test ANOVA à un facteur [origine écologique], $p < 0,05$) (Figure D). Cette différence de profil métabolique s'explique par le fait que la mycorrhizosphère est un milieu beaucoup

plus riche en source de carbone. En effet, la racine exsude beaucoup de composés organiques et notamment des acides organiques et des sucres (Dakota et Phillips, 2002) ce qui en fait un milieu propice au développement bactérien. En revanche, à la surface des minéraux, on peut supposer que les bactéries ont accès à des sources de carbone beaucoup moins diversifiées et moins abondantes. Leur préférence pour l' α -D-glucose et le N-acétyl-D-glucosamine suggère que ces bactéries auraient la capacité de dégrader le tréhalose ou la chitine tout deux retrouvés chez les champignons. En effet, le tréhalose est constitué de deux molécules de glucose tandis que la chitine est composée de plusieurs groupes d'acétyl-glucosamine. Bien que cette hypothèse reste à vérifier, il apparaît que les communautés bactériennes associées à la surface des minéraux ne consomment que très peu de sources de carbone ce qui suggère que leur métabolisme serait plutôt oligotrophe.

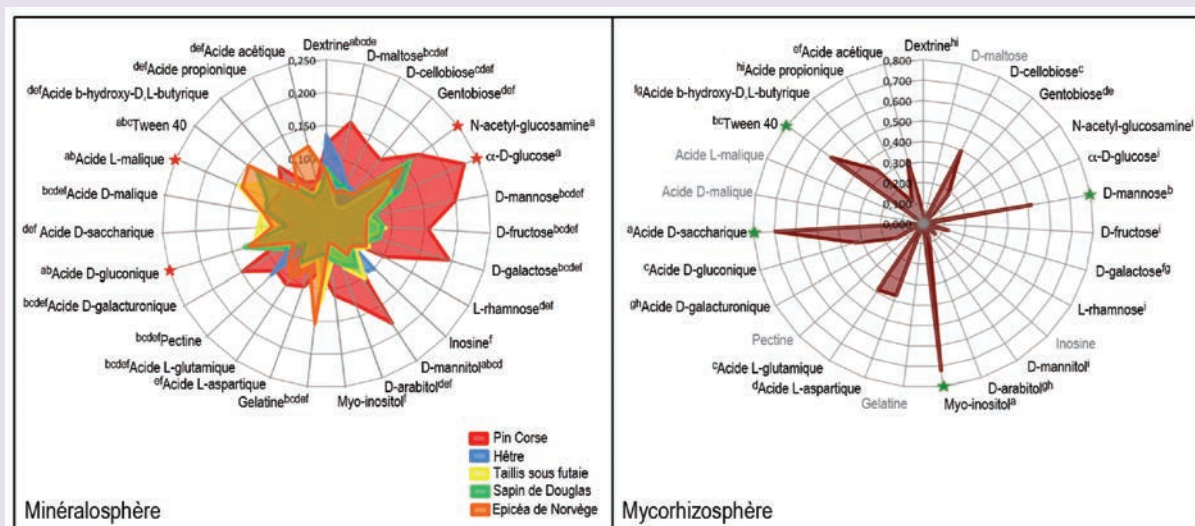


Figure C : Comparaison des profils métaboliques des communautés bactériennes isolées de la minéralosphère ou de la mycorrhizosphère. Pour plus de lisibilité seuls les substrats dont la densité optique était $\geq 0,1$ ont été représentés. Les étoiles représentent les sources de carbones les plus métabolisées. Les sources de carbone associées avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes en accord avec un test ANOVA à un facteur (source de carbone) (Minéralosphère : $p < 0,0001$; Mycorrhizosphère : $p < 0,0001$). Les deux collections bactériennes n'ont pas été testées avec les mêmes tests BIOLOG® (Mycorhizosphère : BIOLOG GENII® ; Minéralosphère : BIOLOG GENIII®). En conséquence, certaines sources de carbone n'ont pas été testées pour les souches de la mycorrhizosphère (en gris sur la figure).

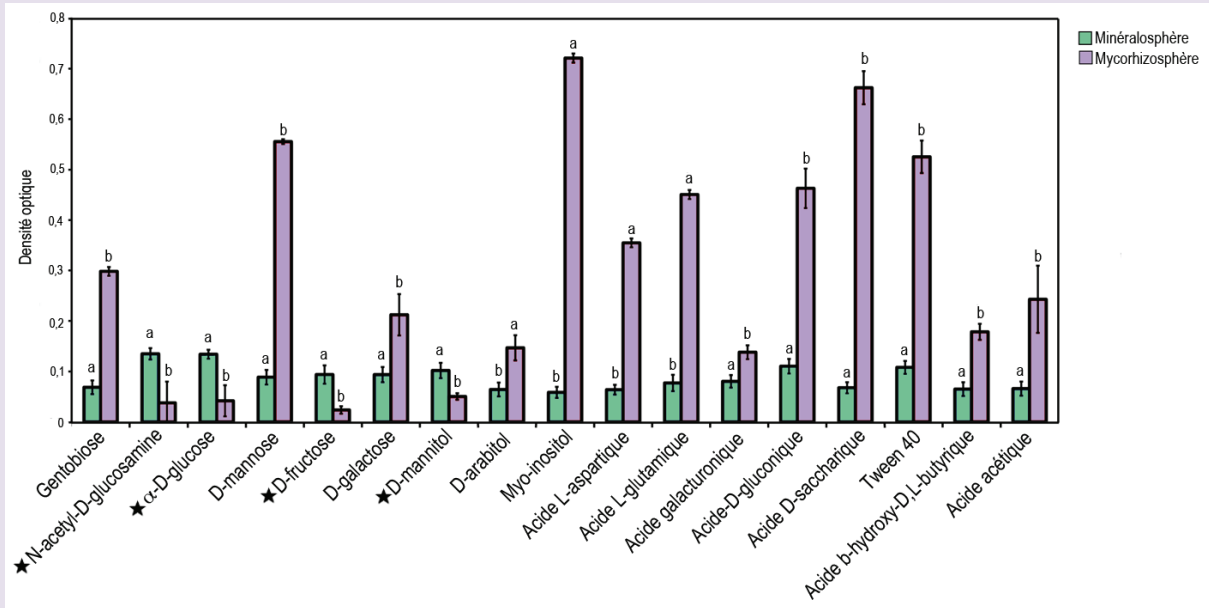


Figure D : Comparaison détaillée du profil métabolique des souches isolées de la minéralosphère et de la mycorhizosphère. Pour chaque source de carbone un test ANOVA à un facteur (origine écologique) a été réalisé ($p < 0,05$). Pour chaque composé testé, les histogrammes étant associés avec la même lettre ne sont pas significativement différents. Les souches de la mycorhizosphère métabolisent significativement plus de sources de carbone excepté pour le N-acetyl-D-glucosamine, l'α-D-glucose, le D-fructose et le D-mannitol (étoiles).

évidence la présence d'isolats bactériens appartenant aux phylums des *Proteobacteria*, des *Firmicutes* ou des *Bacteroidetes* à la surface d'une veine de pegmatite sur un affleurement de granite, quelques-uns de ces isolats étaient uniques à certains minéraux. Par ailleurs, il est intéressant de noter que, dans mon étude, la plupart des isolats bactériens isolés de la surface de l'apatite (57%) étaient capables d'altérer les minéraux en conditions *in vitro*. Cependant, tandis que la majorité des *Firmicutes* montraient des capacités d'altération moyenne, les *Proteobacteria* et plus précisément, les isolats appartenant au genre *Burkholderia*, présentaient la capacité d'altération la plus efficace. Curieusement, les mêmes groupes taxonomiques avec une prédominance des *Firmicutes* ont également été observés sur des échantillons prélevés sur des briques altérées du mur de la ville de Nanjing Ming (Chine) où 20% des isolats étaient capables d'altérer les minéraux (Wang *et al.*, 2011).

Comme les communautés bactériennes de la minéralosphère colonisent des environnements pauvres en nutriments et qu'elles se montrent potentiellement très efficaces pour altérer les minéraux, l'hypothèse selon laquelle elles seraient adaptées à la vie en condition oligotrophe a été testée. L'étude du profil métabolique de ces communautés a révélé qu'elles ne métabolisaient que peu de substrats et que ces derniers n'entraînaient qu'une faible croissance des isolats, ceci étayant la thèse de leur adaptation aux environnements oligotrophes (Figure S4, BOX 2). Ces résultats sont en accord avec ceux de Certini *et al.* (2004). Ces auteurs ont également mis en évidence que l'activité métabolique des communautés microbiennes colonisant les roches était faible (10%) par rapport à celle mesurée pour les communautés du sol. Par ailleurs, j'ai comparé les données métaboliques obtenues au cours de ma thèse à celles obtenues précédemment pour d'autres isolats bactériens provenant du même site expérimental mais d'un environnement relativement plus riche : la mycorrhizosphère (Uroz *et al.*, 2007) (Figures C et D ; BOX 2). Les isolats provenant de la minéralosphère se distinguent de ceux de la mycorrhizosphère de part leur faible potentiel métabolique et leur affinité pour l' α -D-glucose qui est très peu métabolisé par les isolats de la mycorrhizosphère. Bien que d'autres expériences s'avèrent nécessaires pour confirmer cette interprétation, ils sont en accord avec le fait que les surfaces minérales peuvent être considérées comme des environnements extrêmes carencés en carbone et en azote et où les nutriments ne sont pas biodisponibles. Dans ce contexte, il n'est pas étonnant que de telles communautés puissent avoir un comportement opportuniste ce qui leur permet d'avoir accès à des nutriments organiques assez communs tels que l' α -D-glucose en même temps qu'elles libèrent les nutriments inorganiques piégés dans les minéraux. Des parallèles pourraient être faits en établissant les profils métaboliques de communautés bactériennes déjà décrites pour des environnements

extrêmes tels que le désert Arctique, les roches volcaniques ou encore les glaciers (Borin *et al.*, 2009 ; Frey *et al.*, 2010 ; Herrera *et al.*, 2008).

Conclusion

Le travail présenté dans ce premier chapitre a permis de générer trois résultats majeurs. J'ai montré i) que les communautés bactériennes colonisant la surface des minéraux étaient composées de **genres bactériens spécifiques et connus pour leur capacité à altérer les minéraux** ; ii) que ces communautés étaient spécifiquement **adaptées à un environnement minéral pauvre de part leur fort potentiel d'altération et leur comportement oligotrophe** ; iii) qu'il existait une **corrélation positive et significative entre le taux d'altération des minéraux et l'abondance de séquences 16S présentant une forte homologie avec des souches bactériennes ayant un fort potentiel d'altération**. Tous ces résultats confirment le concept de minéralosphère. Néanmoins, nous ignorons encore les moteurs de la structuration de ces communautés bactériennes. Sont-elles là parce que l'altération minérale exercée par des facteurs abiotiques (lessivage, pH, érosion) et biotiques (action de la litière, des racines des arbres, des exsudats racinaires) libère les cations dont elles se nourrissent ? L'altération, dont elles sont vraisemblablement responsables, est-elle le résultat secondaire d'une autre activité métabolique ? Est-ce une capacité développée spécialement afin de pouvoir prélever les nutriments inorganiques présents dans les minéraux ? Une des façons de répondre à ces questions serait d'étudier l'impact des cations nutritifs sur ces communautés bactériennes. Dans la deuxième partie de ma thèse, un apport de minéral en poudre, la dolomie, a été réalisé afin d'étudier l'impact de la biodisponibilité des nutriments qui sont habituellement piégés dans les minéraux, sur la structure taxonomique et fonctionnelle des communautés bactériennes du sol.

CHAPITRE 3 :

IMPACT DE LA BIODISPONIBILITE DES NUTRIMENTS INORGANQUES

SUR LA STRUCTURE TAXONOMIQUE ET FONCTIONNELLE

DES BACTERIES DU SOL ET DE LA RHIZOSPHERE :

MANIPULATION D'UNE PLANTATION

PAR AMENDEMENT CALCO-MAGNESIEN

1. Introduction

Le chaulage est une pratique ancestrale couramment utilisée en agriculture. Cette pratique consiste en un apport calco-magnésien à un sol afin d'en augmenter le pH et d'en compenser les carences en calcium et en magnésium dans le but d'améliorer la croissance des plantes. Ce procédé était cependant très peu utilisé en sylviculture jusque dans les années 80s, car peu rentable et relativement cher.

Dans les années 80s, les scientifiques ont tiré la sonnette d'alarme afin de prévenir contre le jaunissement et la défoliation d'une grande partie des forêts nord européennes. Les forêts de République Tchèque furent les premières à montrer ces signes de dépérissement. Les causes de ce phénomène furent tout d'abord attribuées aux pluies acides provoquées par la production de SO₂ résultant d'une forte industrialisation (Bonneau, 2007 ; Nys, 1989). Lorsque les symptômes se propagèrent à des zones où les quantités de SO₂ étaient deux fois moins élevées, comme dans les Vosges, les scientifiques mirent en cause la sécheresse de 1976. Cependant, l'écart de plusieurs années entre le dépérissement observé et la sécheresse ne permettait pas d'établir une relation concluante entre ces deux phénomènes (Lévy et Becker, 1987). Une étude de Zöttl et Mies (1983) démontra alors une carence en magnésium chez des épicéas mourants de la forêt noire, suggérant que le dépérissement était en fait dû à une carence nutritive. La cause du dépérissement observé fut alors identifiée comme étant une combinaison de ces trois facteurs. La sécheresse aurait stoppé la minéralisation de l'humus et donc la libération de cations nutritifs. L'acidification des sols, due notamment à la nature de la roche mère, aurait été accentuée par les pluies acides conduisant au drainage/lessivage des nutriments disponibles dans ces sols, conduisant ainsi à des carences sévères en cations nutritifs pour ces écosystèmes forestiers.

Suite à l'identification des causes du dépérissement observé dans les années 80s, c'est-à-dire une acidification des sols et une carence en cations nutritifs essentiels, plusieurs traitements ont été étudiés. C'est une pratique agricole ancienne qui a été retenue : le chaulage. C'est dans ce contexte, que cette pratique ancestrale a été reconnue comme étant la solution pour restaurer la santé et la nutrition minérale des écosystèmes forestiers.

L'amendement calco-magnésien se fait le plus souvent par apport d'un minéral broyé finement, la dolomie [(CaMg(CO₃)₂), et est directement appliqué sur le sol à traiter. Cet apport en poudre d'une roche assez soluble sur une litière acide, permet une mise en disponibilité plus rapide des nutriments inorganiques piégés habituellement dans les minéraux silicatés (Coroneos *et al.*, 1996 ; Bakken *et al.*,

2000 ; Barral *et al.*, 2005). Les effets du chaulage sur les sols forestiers sont maintenant connus et ce, à différents niveaux. Par exemple, au niveau des propriétés physico-chimiques du sol, le chaulage augmente le pH, ceci conduisant à une plus grande capacité d'échange cationique (CEC) (Kreutzer *et al.*, 1995). Plus la CEC augmente, plus le sol a la capacité d'échanger et de fixer les cations nutritifs indispensables à la nutrition des plantes. Des analyses foliaires montrent, en effet, que la nutrition des arbres est meilleure en calcium et en magnésium après un apport en calcaire (Belkacem *et al.*, 1992). De plus, l'amendement calco-magnésien stimule l'activité des lombrics ce qui contribue à une meilleure structuration du sol (Schack-Kirchner & Hildebrand, 1998) améliorant ainsi l'aération des couches superficielles (Judas *et al.*, 1997). Par ailleurs, une augmentation de la biomasse microbienne a été observée sur les sols ayant eu un amendement minéral (Neale *et al.*, 1997 ; Chagnon *et al.*, 2001 ; Kennedy *et al.*, 2004). L'effet d'un apport minéral sur les communautés bactériennes du sol a aussi été étudié. Ainsi on observe que la diversité bactérienne d'un sol chaulé se montre le plus souvent moins riche que celle provenant d'un sol non chaulé (Sridevi *et al.*, 2012 ; Clivot *et al.*, 2012), suggérant que la structure taxonomique des communautés bactériennes du sol est fonction de la disponibilité en nutriments inorganiques et/ou du pH. Sur le plan fonctionnel, le constat est moins clair. Plusieurs études ont ainsi mis en évidence une augmentation des communautés bactériennes nitrifiantes dans les parcelles chaulées (Anderson, 1998 ; Gray *et al.*, 2003 ; Backman *et al.*, 2003). Au contraire, un amendement en phosphate induit une diminution de l'activité phosphatase acide microbienne et n'a aucune conséquence sur leurs autres activités enzymatiques. Ces résultats illustrent que toutes les fonctions associées aux microorganismes ne sont pas affectées de la même manière.

Dans les écosystèmes forestiers pauvres en nutriments, une des communautés bactérienne qui pourrait être affectée est celle des bactéries capables d'altérer les minéraux. Une récente étude a démontré qu'après un chaulage à long terme (30 ans) les communautés bactériennes d'un sol chaulé présentaient un potentiel d'altération plus efficace que celles provenant d'un sol non chaulé (Uroz *et al.*, 2011a). Selon les auteurs, ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait qu'à long terme, le chaulage induirait des déficiences nutritives secondaires dans le sol ou tout du moins une diminution de la concentration de certains éléments (Al, Mg ; Tyler and Olsson, 2001 ; Uroz *et al.*, 2011a). Ces carences nutritives seraient en grande partie dues à l'accélération de la physiologie de la plante. En effet, le sol étant devenu subitement plus riche en nutriments, la plante en a prélevé de plus en plus durant sa croissance, appauvrissant davantage le sol qu'il ne l'était avant le chaulage (Uroz *et al.*, 2011a). Sur le long terme, le chaulage aurait pour conséquence un appauvrissement du sol en nutriments par rapport au sol non traité (phénomène amplifié lors du prélèvement des arbres et des rémanents), ce qui induirait un enrichissement de bactéries présentant un potentiel d'altération efficace dans le sol

amendé. Une autre étude a analysé l'effet d'un amendement minéral, à court terme cette fois-ci, sur la capacité d'altération des communautés bactériennes du sol (Balland *et al.*, 2011). Ces auteurs ont démontré, en testant la capacité d'altération d'un consortium de bactéries isolées du sol, que ces communautés étaient potentiellement plus altérantes dans un sol chaulé que dans un sol non chaulé.

2. Objectifs

Les bactéries capables d'altérer les minéraux jouent un rôle important dans la nutrition des plantes en libérant des nutriments essentiels tels que le calcium, le phosphore, le fer ou le magnésium à partir des minéraux du sol (Barker *et al.*, 1997 ; Calvaruso *et al.*, 2006). Cependant, étant donné que l'altération minérale permet de libérer les nutriments inorganiques constituant la structure cristalline des minéraux, on peut se demander quel est l'impact de la disponibilité de ces nutriments sur la fonction altération des communautés bactériennes du sol et ce, notamment dans le cadre d'un amendement minéral tel que le chaulage. La seule étude réalisée sur ce sujet s'est intéressée à l'effet d'un chaulage à long terme (observation après 30 ans) et a démontré que les communautés bactérienne du sol chaulé étaient plus efficaces pour altérer les minéraux que celles du sol non chaulé (Uroz *et al.*, 2011a). Les carences nutritives induites par le chaulage à long terme seraient responsables de cette structuration. Néanmoins, cette hypothèse reste à vérifier.

L'étude présentée dans ce chapitre avait pour objectif de tester l'hypothèse selon laquelle la disponibilité en nutriment influencerait la capacité d'altération des communautés bactériennes du sol et leur structuration fonctionnelle. L'objectif étant de travailler sur un dispositif de terrain et non plus en microcosmes, j'ai analysé l'impact d'un amendement réalisé depuis environ 4 ans sur la structure taxonomique et fonctionnelle des communautés bactériennes du sol et de la rhizosphère en conditions *in situ*, dans une petite plantation de chêne installée à cet effet.

3. Méthodes employées

Pour répondre à cet objectif, huit plants de chênes (*Quercus petraea*) âgés de quatre ans, mycorhizés par *Scleroderma citrinum* et issus de la pépinière de l'INRA de Champenoux, ont été plantés en avril 2008 sur le site expérimental de Breuil-Chenue (Morvan, 58) dans le cadre de la thèse de Christelle Collignon. La moitié d'entre eux a été amendée par un apport de dolomie en poudre [$\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$]. La quantité de dolomie à apporter pour l'amendement a été calculée à partir des analyses d'une parcelle de référence (Mareschal, 2008) et en fonction des besoins théoriques du sol en

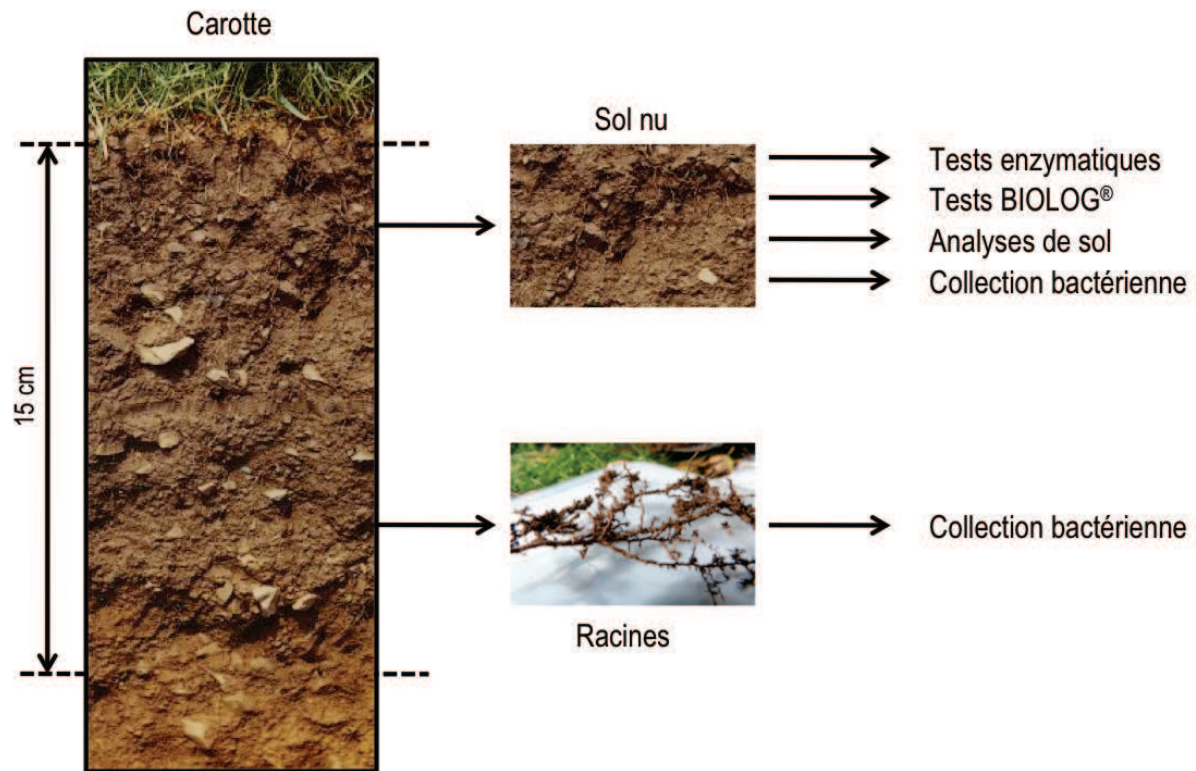


Figure 3.1 : Utilisation des carottes de sol.

Après prélèvement, l'horizon organo-minéral (15cm) de chaque carotte a été trié afin de séparer le sol nu des racines. Le sol nu a ensuite été utilisé pour des tests enzymatiques (5g), des tests en microplaque BIOLOG® (5g), des analyses de sol (15g) et pour la réalisation d'une collection bactérienne (5g). Les racines quand à elles ont été pesées pour chaque échantillon avant d'être utilisées pour la collection bactérienne.

magnésium et en calcium (selon le Dr. C. Nys, données en cours de publication). Dans le cadre de ma thèse, j'ai pris en charge l'organisation de l'échantillonnage ainsi que les analyses connexes à ces échantillons. Après trois ans et demi, un carottage de sol a été réalisé au pied de chacun des arbres afin d'effectuer des analyses de sol, des analyses enzymatiques via des microplaques BIOLOG® Ecoplates et une collection bactérienne dans le but d'étudier i) l'impact global de l'amendement minéral sur le potentiel fonctionnel microbien et ii) la structure taxonomique et fonctionnelle des communautés bactériennes cultivables provenant du sol et de la rhizosphère et capables d'altérer les minéraux (Figure 3.1).

Le détail du traitement des échantillons et de la réalisation de la collection bactérienne est décrit dans le matériel et méthodes du manuscrit associé. Pour chaque carotte de sol collectée, les racines ont été triées et débarrassées du sol non adhérent pour ensuite être utilisées pour la réalisation de la collection d'isolats bactériens. Des analyses de sol, des tests en microplaques BIOLOG® Ecoplates et une collection bactérienne ont été réalisées à partir du sol de chaque carotte (Figure 3.1). Les analyses de sol ont été faites par le Laboratoire d'analyses des sols d'ARRAS (62). Les tests en microplaque BIOLOG® Ecoplates ont été effectués selon les instructions du fabricant à partir d'une suspension de sol (Protocole n°16). Enfin, une collection de 237 isolats bactériens a été réalisée à partir d'une suspension de sol ou d'une suspension obtenue à partir des racines (protocole n°13). Au total, 176 de ces isolats bactériens ont été testés pour leur capacité à solubiliser le phosphore inorganique sur un milieu gélosé, le TCP (Tri Calcium Phosphate). Ce milieu d'une couleur blanc laiteux et contenant du phosphate tricalcique insoluble $[Ca_3(PO_4)_2]$, a la particularité de devenir translucide en présence d'un isolat bactérien capable de solubiliser le phosphore inorganique. La mesure du halo translucide ainsi formé permet de déterminer le potentiel d'altération des souches bactériennes testées. En plus de ces tests, une caractérisation taxonomique par séquençage d'une partie variable du gène de la petite sous-unité ribosomique procaryotique (16S rRNA) a été réalisée et les séquences obtenues ont été déposées sur la base de données GenBank (JX154208-JX154383).

Les données générées dans cette étude ont fait l'objet d'analyses statistiques. Les analyses de variance (ANOVA) et les tests t de Student ont été effectués au seuil de 0,05 en utilisant le logiciel SuperAnova (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA). La distribution des souches bactériennes en fonction de leur origine (traitement et compartiment) a été testée par un test du χ^2 ($p=0,05$) via le logiciel Statview (SAS Institute, Cary, NC). Les proportions obtenues dans cette étude ont été transformées par la formule « $\arcsin(1/10)*\text{Racine}(\%)$ » avant les analyses statistiques.

4. Synthèse des résultats

Cette étude est, à ma connaissance, **une des premières à analyser l'impact d'un amendement minéral à cours terme sur les communautés microbiennes des sols forestiers et notamment sur la structure taxonomique et fonctionnelle des communautés bactériennes cultivables capables d'altérer les minéraux**. Au niveau des caractéristiques du sol, les analyses ont montré une augmentation significative du pH et des taux de calcium et de magnésium des sols suite à l'amendement minéral. Ces analyses ont par ailleurs révélé qu'aucune autre caractéristique chimique mesurée n'avait été modifiée, démontrant bien que **les modifications observées résultaient uniquement de l'amendement minéral réalisé**.

Les analyses enzymatiques réalisées en microplaques BIOLOG® Ecoplates, n'ont montré aucune différence dans le profil métabolique des communautés microbiennes des sols, **excepté pour l'asparagine**, un acide aminé connu pour être notamment retrouvé dans les exsudats racinaires (Lea *et al.*, 2007). Les communautés microbiennes des sols amendés semblent métaboliser davantage cet acide aminé suggérant que les plantes l'exudent plus que dans les parcelles amendées. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les plantes étant en condition non-limitante, assimilent plus de nutriments et en conséquence, exudent davantage de déchets, ce qui se traduit par une augmentation de leur croissance (Burke et Raynal, 1998 ; Rosberg *et al.*, 2006 ; Saarsalmi *et al.*, 2011).

L'analyse de la capacité des isolats bactériens à solubiliser le phosphore inorganique montre **que les communautés bactériennes du sol amendé ont un potentiel d'altération plus faible que celles provenant des parcelles amendées, suggérant que la fonction altération de ces bactéries serait influencée par la disponibilité en nutriments inorganiques**. Considérant l'origine écologique des souches, la rhizosphère se caractérise par des souches bactériennes ayant un potentiel d'altération plus élevé que celles provenant du sol environnant. Ce résultat démontre que **la sélection de communautés bactériennes altérantes par la rhizosphère** (Leyval and Berthelin, 1991 ; Calvaruso *et al.*, 2007 ; Collignon *et al.*, 2011 ; Puente *et al.*, 2004) **est également vrai chez des arbres relativement jeunes**. L'effet sélectif imposé par la racine semble néanmoins plus important que l'amendement minéral, car aucune différence significative n'a été observée entre l'habitat rhizosphérique amendé et non-amendé. Dans les deux traitements, l'habitat rhizosphérique se singularise par **une plus forte proportion de bactéries appartenant au genre *Burkholderia*, déjà connu pour sa capacité à altérer les minéraux** (Calvaruso *et al.* 2007 ; Uroz *et al.*, 2007). Au niveau

taxonomique, aucune différence notable n'a été observée dans la structure taxonomique des communautés bactériennes provenant du traitement amendé ou non amendé.

Les résultats de cette étude permettent donc non seulement de corroborer d'autres observations mais également de confirmer **l'hypothèse selon laquelle la capacité d'altération des communautés bactériennes des sols forestiers est influencée par la disponibilité en nutriments suggérant un possible rôle de cette fonction dans l'assimilation des cations nutritifs.**

5. Article : A short-term mineral amendment impacts the mineral weathering bacterial communities in an acidic forest soil.

C., Lepleux, S., Uroz, C., Collignon, J-L., Churin, M-P., Turpault and P. Frey-Klett

Soumis dans *Soil Biology and Biochemistry*

Résumé

L'amendement minéral est une pratique utilisée en sylviculture pour augmenter la biodisponibilité en nutriment et améliorer la fertilité du sol et ce, notamment dans les écosystèmes forestiers pauvres en nutriments. Cependant, si on sait que ce type d'amendement engendre des modifications au niveau des caractéristiques du sol et accélère la croissance des arbres, son impact sur les communautés bactériennes ayant la capacité d'altérer est encore inconnu. Dans cette étude, l'impact à court terme d'un amendement minéral sur la structure taxonomique et fonctionnelle des communautés bactériennes altérantes du sol a été étudié. Pour ce faire, des chênes (*Quercus petraea*) âgés de quatre ans ont été plantés avec un apport en dolomie $[CaMg(CO_3)_2]$ ou non, sur le site expérimental de Breuil Chenue caractérisé par un sol acide et pauvre en Ca et Mg biodisponibles. Trois ans et demi après l'amendement, des échantillons de sol ont été prélevés pour réaliser une collection bactérienne, faire des analyses de sol et évaluer le potentiel métabolique des communautés microbiennes du sol. Sur la base d'un biotest en *in vitro* permettant de quantifier la solubilisation du phosphore inorganique, nous avons pu démontrer que les communautés bactériennes du sol non-amendé présentaient un potentiel d'altération supérieur à celles provenant du sol amendé. Aucune différence n'a cependant été observée concernant la structure fonctionnelle des communautés bactériennes provenant de la rhizosphère amendée et non amendée. Les analyses taxonomiques ont révélé une dominance d'isolats bactériens appartenant au genre *Burkholderia*. Tous ces résultats suggèrent que la biodisponibilité des cations nutritifs dans le sol impacte la distribution et le potentiel d'altération des communautés bactériennes provenant du sol contrairement à celles provenant de la rhizosphère.

1 **Title: A short-term mineral amendment impacts the mineral weathering bacterial communities in**
2 **an acidic forest soil**

3

4 **Authors: Lepleux, C.^{1,2}, Uroz, S.^{1,2*}, Collignon, C.^{1,2}, Churin J-L. ¹, Turpault, M.-P.² and Frey-Klett,**
5 **P.¹**

6

7

8 ¹INRA, UMR 1136 INRA Université de Lorraine “Interactions Arbres Micro-organismes”, Centre INRA de
9 Nancy, 54280 Champenoux ; ²INRA, UR 1138 “Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers”, Centre
10 INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France.

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20 **Runing title:** Mineral amendment affects soil bacterial communities

21 *Corresponding author: Mailing address: UMR 1136 INRA-Université de Lorraine, Interactions Arbres
22 Micro-organismes, 54280 Champenoux, France. Phone : +33 (0)3 83 39 40 81, Fax: +33 (0)3 83 39 40
23 69. E-mail: uroz@nancy.inra.fr

24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56

Abstract

Mineral amendment (i.e. calcium, phosphorous, potassium and /or magnesium) is a management practice used in forestry to improve nutrient availability and recover soil fertility, especially in nutrient-poor forest ecosystems. However, if this amendment leads to modifications of the soil characteristics and an improvement of the tree growth, its impact on the soil bacterial communities and especially the mineral weathering bacterial communities remains unknown. In this study, we investigated the short-term impact of a mineral amendment on the taxonomic and functional structure of the mineral weathering bacterial communities. To do this, a plantation of four-year old oak (*Quercus petraea*) trees amended or not with dolomie [CaMg(CO₃)₂] was established in the experimental forest site of Breuil-Chenue, which is characterized by an acidic soil and a poor Ca and Mg availability. Three years after amendment, soil samples were used to perform bacterial collections as well as to determine the soil characteristics and the metabolic potentials of the soil microbial communities. Based on a bioassay for quantifying the solubilisation of inorganic phosphorous, we demonstrated that the bacterial isolates coming from the non-amended bulk soil were significantly more efficient than those of the amended treatment. No difference was observed between the bacterial isolates coming from the amended and non-amended rhizosphere. Notably, the taxonomic analyses revealed a dominance of bacterial isolates belonging to the *Burkholderia* genus. Taken together, our results suggest that the bioavailability of nutritive cations into the soil impacts the distribution and the efficacy mineral weathering bacterial communities coming from the soil but not those coming from the rhizosphere.

57

58 1. Introduction

59 In nutrient-poor environments such as temperate forest ecosystems developed on acidic soils, the
60 inorganic nutrients are poorly accessible to the tree roots. Moreover, in forestry, the wood exportation
61 leads to a loss of the nutrients, which are not recycled during the organic matter degradation process,
62 and consequently to potential nutritive deficiencies. The availability of nutritive cations is therefore a key
63 factor for the long-lasting functioning of these ecosystems. Aside from the contribution of atmospheric
64 deposits and recycling of chemical elements contained into the falling leaves and dead roots, soil
65 minerals constitute the main reservoir of nutritive cations in these acidic temperate forest ecosystems
66 (Likens et al, 1977 ; Ranger and Turpault, 1999). However due to the relatively acidic soil conditions, all
67 the weatherable soil minerals have been dissolved and the remaining soil minerals (ie quartz, micas,
68 feldspars) are poorly weatherable making the nutritive cations entrapped in their crystal structure not
69 easily accessible to the tree roots. Consequently, the release of these nutritive cations by mineral
70 weathering processes is crucial. Aside from the purely abiotic factors involved in the mineral weathering
71 process, it is now established that soil microorganisms, and particularly bacteria, contribute to the
72 release of inorganic nutrients from minerals and therefore affect ion cycling and plant nutrition (Barker *et*
73 *al.*, 1997 ; Calvaruso *et al.*, 2006 ; Gadd, 2007; Uroz *et al.*, 2009a).

74 The ability to weather minerals has been demonstrated for a large range of bacterial strains and
75 particularly those coming from the rhizosphere of tree species from temperate forests (Leyval and
76 Berthelin, 1991 ; Calvaruso *et al.*, 2006, 2010 ; Uroz *et al.*, 2007). Among these mineral weathering
77 bacterial isolates, strains belonging to *Burkholderia* and *Collimonas* genera appeared to be the most
78 efficient (Leveau *et al.*, 2010; Uroz *et al.*, 2007; 2009b, Collignon *et al.*, 2011). In this context and due to
79 the absence of currently identified marker genes of the mineral-weathering function, these two bacterial
80 genera and more especially their relative abundance in the soil bacterial community have been
81 proposed as bioindicators of mineral weathering potential of the forest soil bacterial communities (Uroz
82 *et al.*, 2011a). However, the relative efficacy of the mineral weathering bacteria can be influenced by the
83 nutrient bioavailability or by the tree species (Calvaruso *et al.*, 2006, 2010). Using a microcosm
84 experiment, Calvaruso *et al.* (2006) demonstrated that in the presence of biotite, the mineral weathering
85 strain *Burkholderia glathei* PML1(12) can significantly improve the growth of Scot pine in nutrient-poor
86 conditions by increasing the amount of potassium and magnesium released from the mineral, but not in
87 nutrient-rich conditions. Moreover, trees can also impact the distribution and the efficacy of the mineral
88 weathering bacteria. Indeed, Calvaruso *et al.* (2010) revealed that the rhizosphere of oak and beech
89 trees was enriched in efficient mineral weathering bacterial communities compared to the surrounding
90 bulk soil. Notably, such enrichment was not observed in the spruce rhizosphere. Calvaruso *et al.* (2010)

91 explained this absence of functional structuration of the mineral weathering bacterial communities by
92 the ability of the spruce trees to produce massive amount of protons in the soil contrary to the oak and
93 beech trees.

94 As said above, nutrient bioavailability remains a central point for soil fertility and the long-lasting
95 functioning of forest ecosystems. In forestry practices, wood exportation leads to a loss of nutrients,
96 which are not recycled during the organic matter degradation process and consequently to potential
97 nutritive deficiencies. To correct these deficiencies and restore soil fertility, mineral amendment has
98 been widely applied in the past twenty years in managed European forests to restore forest health. This
99 practice is based on the addition of inorganic nutrients, such as calcium, magnesium and/or
100 phosphorous. However, these amendments aside from the soil modifications they induce, such as the
101 increase of the bioavailability of inorganic nutrients and of the pH, alter also the structure of the soil
102 bacterial communities as well as their functional diversity (Sridevi, *et al.*, 2011 ; Gray *et al.*, 2003 ;
103 Backman *et al.*, 2003 ; Maschner *et al.*, 2003 ; Gomez *et al.*, 2006). Such modifications can be
104 observed at short term, few months to few years after the soil amendment, but also at long term even
105 after decades. Backman *et al.*, (2003), demonstrated by using a combination of SSCP and DGGE
106 analyses that mineral amendment induced growth of ammonia-oxidising bacteria 6 years after its
107 application. Using a cultivation-dependent approach, Uroz *et al.* (2011b) demonstrated that a mineral
108 amendment induced an enrichment of efficient soil mineral weathering bacterial isolates even after 30
109 years. Altogether these data suggest that the bacterial communities can adapt to the modifications of
110 their environment, such as the nutrient availability.

111 The objective of the present study was to monitor the impact of a mineral amendment on the
112 taxonomical structure and the functional abilities of the forest soil bacterial communities based on the
113 hypothesis that the increased availability of nutritive cations in the amended soil should alter the
114 frequency and the efficacy of the mineral weathering bacterial communities. To do this, we settled a
115 small-scale oak (*Quercus petraea*) plantation. Four-year old trees were planted in 2008 in the forest
116 experimental site of Breuil-Chenue (France), and amended or not with dolomie (CaCO_3). After a 3-year
117 period, a cultivation-dependent approach was applied in order to determine the short-term impact of this
118 mineral amendment on the structure of the mineral weathering bacterial communities colonizing the oak
119 rhizosphere and the surrounding bulk soil. This approach was chosen due to the absence of currently
120 identified bacterial marker genes of the mineral weathering functions. A total of 237 bacterial strains
121 were isolated from the rhizosphere and the surrounding bulk soil under amended and non-amended
122 conditions. The mineral weathering ability of each bacterial isolate was determined using an *in vitro*
123 assay testing their efficacy to solubilise inorganic phosphorous (Frey-Klett *et al.*, 2005). The bacterial
124 isolates were genotypically characterized by amplifying and sequencing a portion of the 16S rRNA gene

125 sequence. The same soil samples were also used to perform soil analyses and to determine the impact
126 of the mineral amendment on the metabolic potentials of the soil microbial communities.

127

128 **2. Materials and Methods**

129 *2.1. Study site*

130 The Breuil Chenue experimental site is located in the Morvan (47°18'N, 4°5'E; France), on a plateau
131 with an altitude of 630 m. The soil is an Alocrisol, developed on the "Pierre qui Vire" granite. The bulk
132 soil is sandy-loam textured (60% sands and < 20% clays) and acidic (pH ca 4) (Mareschal *et al.*, 2010).
133 In april 2008, one plot of 140m² (12x12m) was deforested and weeded to replant four-year old oak
134 (*Quercus petraea*) trees (n=8). The soil of half of these trees was amended with dolomie (CaMg(CO₃)₂)
135 in order to test the impact of a short-term amendment on the soil characteristics and on the soil bacterial
136 communities. Mineral amendment was calculated according to Mareschal *et al.* (2008) to supply the
137 trees with magnesium and calcium. For each oak tree, a pit of 80x80x80cm was buried. The soil was
138 amended with 120g of dolomie (CaMg(CO₃)₂), homogenously mixed with the soil. The amendment was
139 done with respect to the soil horizons. The soil of the non-amended trees was mixed similarly in order to
140 have the same experimental disturbances. After a three years and half period, soil samples were
141 collected prior microbiological, enzymatic and soil analyses. For enzymatic and soil analyses, the bulk
142 soil samples were sieved (2 mm mesh) and homogenized. Soil analyses were performed by the INRA
143 Soil Analyses Laboratory of Arras (France).

144

145 *2.2. Soil Sampling and collection of bacterial strains*

146 Soil and rhizosphere samples were collected in october 2011. One soil core (10 cm diameter, 20cm
147 depth) was sampled at ca. 30 cm of the trunk of each oak tree. Only the horizon 5-15cm was used for
148 all this study. For each soil core, the loosely adhering soil was removed and roots were cut off, with
149 roughly three roots per sample. Five grams of non-adhering bulk soil from each tree were collected. The
150 bacterial strains were isolated from the two compartments as follows: (1) Bulk soil, 5 g of fresh bulk soil
151 was suspended in 10ml sterile mQ water and vortexed two times for 1 minute. The resulting
152 suspensions were called "LS" and "NLS" for amended and non-amended bulk soil, respectively. (2)
153 Rhizosphere soil, about three fresh roots were suspended in 5ml sterile mQ water and vortexed two
154 times for 1 minute. The resulting suspensions were called "LR" and "NLR" for amended and non-
155 amended rhizosphere, respectively. A volume of 0.3 ml of these suspensions was sampled and serial
156 10 fold dilutions were spread onto a 10% tryptic soy agar (TSA) medium (Tryptic soil broth from Difco,
157 3g.l⁻¹ and agar, 15g.l⁻¹). Plates were incubated at 25°C for 7 days. The bacterial isolates were purified
158 by three successive platings on 10% TSA. A total of 237 bacterial strains were isolated with ca. 30

159 bacterial strains per tree and 15 isolates per treatment and compartment: 60 LS isolates, 59 NLS
160 isolates, 59 LR isolates and 59 NLR isolates. All the bacterial isolates used in this study were
161 cryopreserved at -80°C in 25% glycerol and then cultivated on 10% TSA.

162

163 2.3. *Inorganic phosphorus solubilisation assay*

164 The ability of bacterial isolates to solubilise tricalcium orthophosphate was assessed following the
165 modified protocol of Frey-Klett *et al.* (2005). This test was commonly used to evaluate the mineral
166 weathering potential of bacterial strains (Calvaruso *et al.*, 2007 ; Uroz *et al.*, 2009). The bacterial
167 isolates were grown in Luria Bertani liquid media at 25°C for 48h. The bacteria were then collected and
168 suspended in 2ml sterile water to obtain a suspension at $\lambda_{595nm} = 0.8$ (ca. 10^9 cells mL⁻¹). Three
169 microliters of this suspension were then dropped three times in a plate with 15 ml of tricalcium
170 phosphate (TCP) medium containing 0.4g Ca₃(PO₄)₂, 1g glucose, 0.1g MgSO₄, 0.1g NaCl and 0.5g
171 NH₄Cl per liter. After 11 days of incubation at 25°C, the diameter of colonies and the diameter of the
172 discoloration zone were measured to appreciate the ability of each bacterial isolates to solubilise
173 inorganic phosphorus. The relative efficacy to solubilise inorganic phosphorus was calculated in relation
174 to the control strain *Burkholderia glathei* PML1(12) (Calvaruso *et al.*, 2006) included in the tests and for
175 which the efficiency is considered as 100%.

176

177 2.4. *PCR amplification of the 16S rRNA gene from the bacterial isolates*

178 The 16S rRNA gene amplification was performed using the universal set of primers pA (5'-
179 AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 907r (5'-CCGTCAATTCMTTGGAGTTT-3'), (Edwards *et al.*,
180 1989 ; Lane, 1991). Polymerase chain reactions were performed in a total reaction volume of 50 µl
181 containing 1x PCR Mastermix (Eppendorf ®), 0.1µM primers and 1µl of cell extract. Cell extract was
182 prepared by adding colonies of each isolate to 100 µl of sterile water. The following temperature cycle
183 was used: an initial denaturation step of 5 min at 95°C followed by 30 cycles of 1 min denaturation at
184 95°C, 1 min annealing at 53°C and 1 min 30 s extension at 72°C, and a final extension step of 10 min
185 at 72°C. PCR products were purified and concentrated using the microtiter plate PCR purification
186 system (Millipore). PCR controls with no template or extraction controls as a template were negative.

187

188 2.5. *Phylogenetic analyses*

189 The partial 16S rDNA gene sequences of the bacterial isolates were aligned with previously described
190 16S rDNA gene sequences of β-, γ-, α-proteobacteria, Bacteroidetes and Gram positive bacteria
191 (Firmicute and Actinobacteria) using Clustal X (version 1.8) (Thompson *et al.*, 1994). Phylogenetic
192 algorithms were obtained and tree design (DNA-DIST, NEIGHBOR, and SEQBOOT) was performed

193 using the PHYLIP package (version 3.69; J. Felsenstein, University of Washington, Seattle
194 [<http://evolution.genetics.Washington.edu/phylip.html>]). A bootstrap analysis was based on 100
195 replicates.

196

197 *2.6. Metabolic assay*

198 The metabolic potential of the soil microbial communities was investigated in order to analyse the
199 impact of the mineral amendment on their metabolic activities. To do this, Ecoplate microplates from
200 BIOLOG® were used. Briefly, five grams of soil from each soil sample were shaken overnight in 45 ml
201 sterile water on an orbital shaker at 25°C. Hundred and fifty microliters of a 10⁻¹ dilution of each soil
202 sample was then used to inoculate the microplates. The plates were incubated at 25°C, and colour
203 development was measured at 595 nm with a microplate reader (Bio-Rad model 550) after a 48 h
204 incubation period.

205

206 *2.7. Statistical analyses*

207 The effect of mineral amendment on the ability of the bacterial isolates to solubilise inorganic
208 phosphorus was determined by analyses of variance (ANOVA) at a threshold level of 0.05 and by the
209 Student t test using the SuperAnova software (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA). Three classes of
210 bacterial isolates were done differing in their relative efficacy to solubilise inorganic phosphorus: >30%,
211 30-60% and <60%. The proportion of bacterial isolates per classes was compared between the
212 compartments and treatments, using a χ^2 test ($p=0.05$) with the Statview software (SAS Institute, Cary,
213 NC). The distribution of the bacterial isolates differing in their taxonomic belonging was also compared
214 between the compartments and the treatment, using a χ^2 test ($p=0.05$). An arcsin transformation of the
215 percentage values and a logarithm transformation of the cfu.g⁻¹ values used in this study were applied
216 before statistical analyses. In all the study, the term “origin” of the bacterial strains refers to their
217 compartment and treatment origin (LR, LS, NLS or NLR).

218

219 *2.8. Accession numbers*

220 The sequences of the bacterial isolates have been deposited in the GenBank database under
221 accession numbers JX154208-JX154383.

222

223 **3. Results**

224

225 *3.1 Soil analyses*

Table 1: Soil characteristics in the non-amended and in the amended plots.

Treatment	pH	Total Organic C	Total N	¹ P ₂ O ₅	C/N	CEC ²	Ca ³	Mg ³	Al ³	K ³	EA ⁴
		g.kg ⁻¹				cmol ⁺ .kg ⁻¹					
Non amended	4.5 ^a ± 0.03	24.5 ± 1.6	1.31 ± 0.08	0.01 ± 0.00	18.8 ± 0.2	3.60 ± 0.14	0.06 ^a ± 0.01	0.05 ^a ± 0.05	3.60 ± 0.14	0.09 ± 0.01	3.73 ± 0.16
Amended	4.8 ^b ± 0.1	24.03 ± 3.41	1.24 ± 0.17	0.01 ± 0.00	18.8 ± 0.2	3.62 ± 0.40	0.38 ^b ± 0.11	0.15 ^b ± 0.04	3.01 ± 0.40	0.09 ± 0.01	3.16 ± 0.40

^{a,b} Means are significantly different according to a one factor (treatment) ANOVA and a Student-Fischer test at threshold $p=0.05$. ($p_{pH}=0.04$; $p_{Ca}= 0.0124$; $p_{Mg} = 0.0154$).

¹ P₂O₅ : assimilable phosphorous

² CEC : Cationic exchange capacity

³ Ca, Mg, Al, and K exchangeable

⁴ EA : Exchangeable acidity

226 Soil analyses revealed significant differences between amended and non-amended treatments only
227 due to the dolomie supply, as stated by the significant higher concentrations of exchangeable Ca and
228 Mg measured in the amended soils samples (one-factor ANOVA (treatment) test [$p=0.012$ and 0.015 for
229 Ca and Mg respectively]) (Table 1). Moreover, the amended soils were significantly less acidic than the
230 non-amended soils ($p=0.04$). The mineral amendment modestly increased the soil pH without
231 modification of the Cationic Exchange Capacity (CEC) neither the carbon nor nitrogen contents. None of
232 the other soil characteristics measured in this study were modified by the dolomie supply.

233

234 3.2. *Metabolic assay*

235 Metabolic assays performed on the soil replicates revealed significant differences between the
236 amended and non-amended conditions (data not shown). Among the 31 carbon sources present in the
237 Ecoplates, 10 were not metabolized whatever the conditions. Detailed analyses revealed that the
238 microbial communities from the amended and non-amended treatments displayed very similar
239 metabolic potentials, except that L-asparagin was significantly more metabolized in the amended
240 treatment according to a one factor (substrate) ANOVA test ($p=0.028$) (data not shown).

241

242 3.4. *Quantification of the culturable bacterial communities*

243 Total culturable bacterial communities were recovered on 10% TSA plates from the bulk soil and
244 rhizosphere compartments in amended and non-amended treatments, at densities ranging from 7.7×10^5
245 (non-amended soil), 1.5×10^6 (amended soil), 3.7×10^6 (non-amended rhizosphere) to 4.9×10^6 (amended
246 rhizosphere) cfu.g⁻¹ (dry weight) soil. According to a one factor (origin) ANOVA test, performed on the
247 log₁₀ transformed data, the bacterial densities appeared significantly higher in the rhizosphere, whatever
248 the treatment, than in the non-amended soil ($p=0.046$). Notably, the density measured in the amended
249 soil was not significantly different from the other compartments whatever the treatment considered.

250

251 3.5. *Relationship between phosphorus solubilisation ability of bacterial isolates and mineral amendment*

252 A subsample of 176 randomly selected isolates (44 LS, 49 LR, 38 NLS and 45 NLR) to be
253 representative of the soil bacterial communities living in each soil compartment considered was tested
254 for their ability to solubilise inorganic phosphorus. Whatever the treatment, the bacterial isolates
255 collected in rhizosphere compartments were significantly more efficient to solubilise inorganic
256 phosphorus than those from the surrounding bulk soil, according to a one factor (origin) ANOVA test
257 ($p<0.0001$). Moreover, according to the same ANOVA test, bacterial isolates collected from the non-
258 amended soil compartment were more efficient than those from the amended soil compartment (Figure
259 1). Analysis of the distribution of the bacterial isolates according to their efficacy to solubilise inorganic

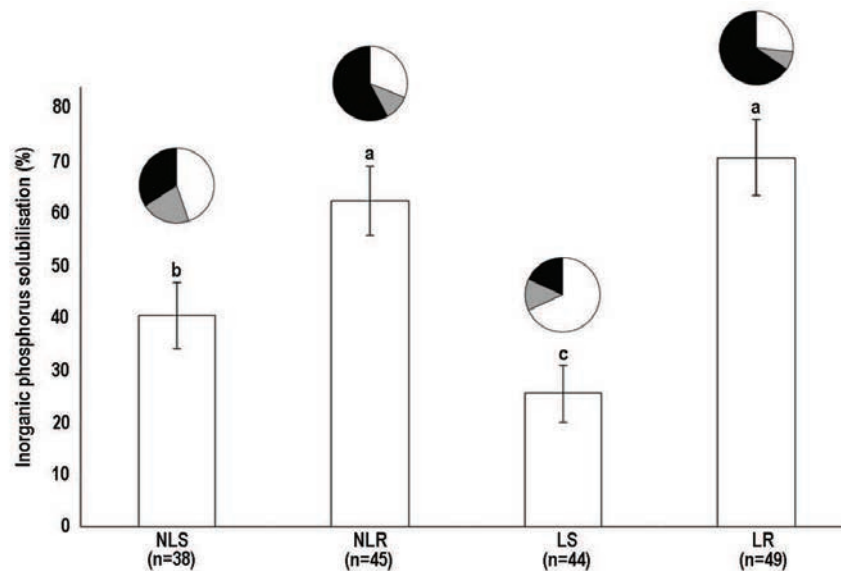


Figure 1: Relative efficacy of the bacterial isolates to solubilise inorganic phosphorus.

The relative efficacy to solubilise inorganic phosphorus was expressed as a percentage of the reference strain *Burkholderia glathei* PML1(12) for which the efficacy to solubilise phosphorous is considered as 100%. Bars associated with the same letter are not significantly different according to a one factor (origin) ANOVA test ($p < 0.0001$). The pie chart represents the distribution of the 176 bacterial isolates belonging to three different classes of inorganic phosphorus solubilisation efficacy: Black, >60%; Grey, 30% to 60% ; White, 0% to 30%. The frequency of efficient phosphorus solubilising bacteria was higher in rhizosphere compartments compared to the bulk soil compartment according to a χ^2 test ($p < 0.0001$). On the other hand, there was more efficient isolates to solubilise phosphorous in the non-amended soil than in the amended one, according to a χ^2 test ($p < 0.0001$). (NLS : non amended soil, NLR: non-amended rhizosphere, LS: amended soil, LR: amended rhizosphere).

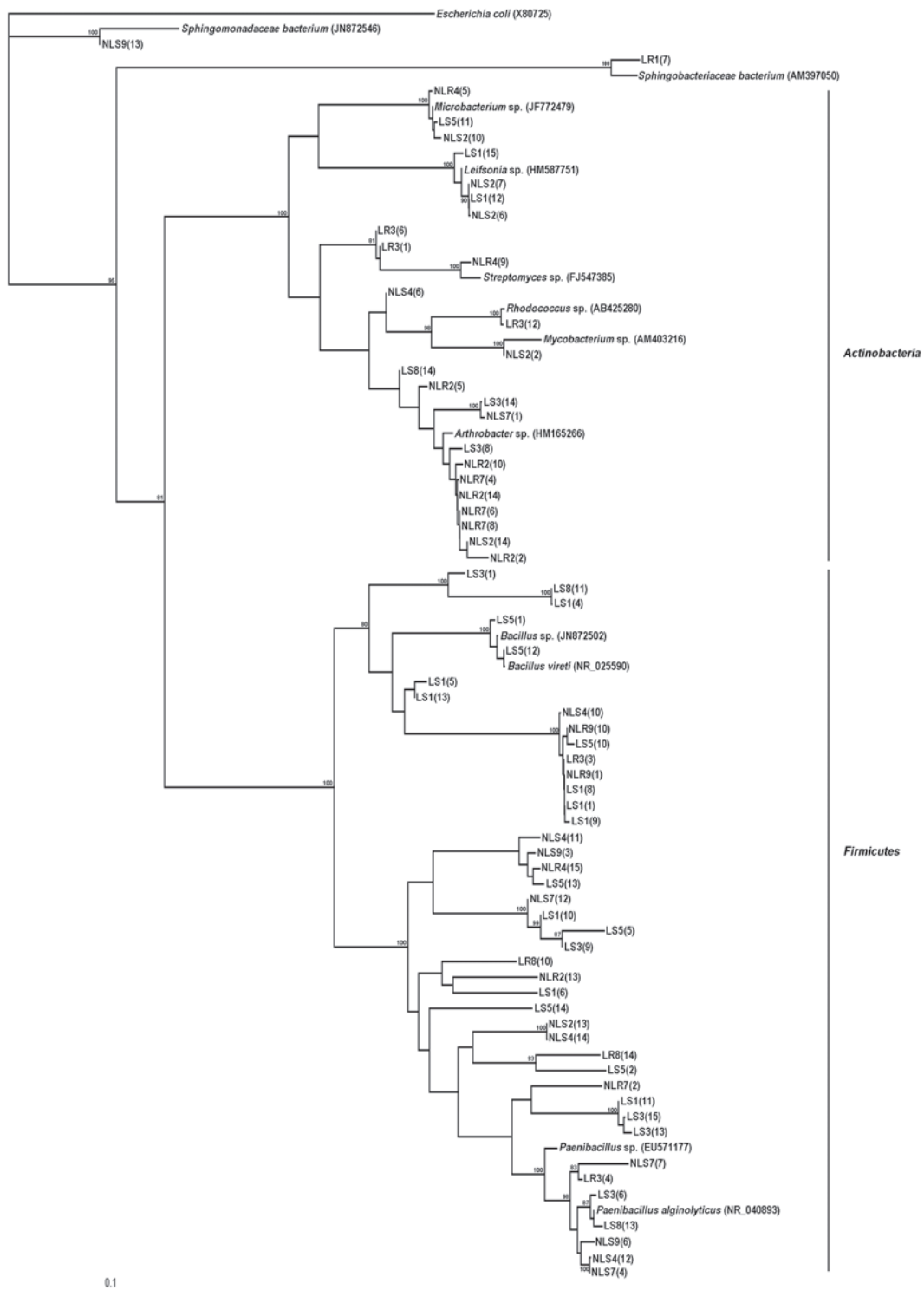


Figure 2 : Phylogenetic tree of Gram-positive and Bacteroidetes bacteria. Neighbour-joining tree showing the phylogenetic relationships of the Gram-positive bacterial isolates recovered from the soil and the oaks rhizosphere of amended and non-amended plots. The tree was based on PCR sequencing of a portion of the 16S rDNA sequence. A bootstrap analysis was performed with 100 repetitions, and only values greater than 80 are indicated at the nodes. The bacterial isolates used in this study were designated by their ecological origins (.LS : amended soil ; NLS : non-amended soil ; LR : amended rhizosphere ; NLR : non-amended rhizosphere).



Figure 3 : Phylogenetic tree of Gram-negative bacteria. Neighbour-joining tree showing the phylogenetic relationships of the Gram-negative bacterial isolates recovered from the soil and the oaks rhizosphere of amended and non-amended plots. The tree was based on PCR sequencing of a portion of the 16S rDNA sequence. A bootstrap analysis was performed with 100 repetitions, and only values greater than 80 are indicated at the nodes. The bacterial isolates used in this study were designated by their ecological origins (.LS : amended soil ; NLS : non-amended soil ; LR : amended rhizosphere ; NLR : non-amended rhizosphere).

260 phosphorus revealed that the frequency of the most efficient bacterial isolates was significantly higher in
261 the rhizosphere compartment compared to the soil, according to a χ^2 analysis ($p < 0.0001$) (Figure 1).
262 Similarly, significantly more efficient bacterial isolates were observed in the non-amended soil compared
263 to the amended one ($p < 0.0001$) (Figure 1).

264

265 3.6. Origin of bacterial isolates and their taxonomical affiliation

266 The different bacterial isolates were assigned to the Alpha-, Beta-, Gamma-proteobacteria,
267 Bacteroidetes and Gram-positive (Actinobacteria, Firmicutes) lineages on the basis of their 16S rRNA
268 gene sequence (ca. 400bp). These 16S rRNA gene sequences exhibited high similarity (95 to 100%)
269 with sequences of environmental bacteria belonging to the genera *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*,
270 *Collimonas*, *Dyella*, *Herbaspirillum*, *Leifsonia*, *Mesorhizobium*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*,
271 *Pseudomonas*, *Rhodanobacter*, *Rhodococcus*, *Sphingobacteriaceae*, *Sphingomonadaceae* and
272 *Variovorax* (Figure 2 and 3). Among these genera, *Burkholderia* was characterized by the higher
273 proportion of bacterial isolates obtained in this study, *Mesorhizobium* were only found in the bulk soil
274 compartment and *Dyella* only in the amended bulk soil (Table 2). The comparison of the diversity of the
275 two compartments showed a significant enrichment of bacterial isolates belonging to the *Burkholderia*
276 and *Arthrobacter* genera and a decrease of the *Paenibacillus* genus in the rhizosphere compared to the
277 surrounding bulk soil, according to a χ^2 analysis ($p < 0.0001$). There was no significant difference
278 between the taxonomical structure of the amended and non-amended samples, according to a χ^2
279 analysis ($p = 0.89$).

280

281 3.7. Inorganic phosphorus solubilisation and taxonomic affiliation of the bacterial communities

282 The analysis of the ability to solubilise inorganic phosphorus measured for each bacterial genus
283 containing a minimum of three strains showed that strains belonging to the *Pseudomonas*, *Burkholderia*
284 and *Collimonas* genera were significantly more efficient to solubilise inorganic phosphorous than the
285 other genera ($p = 0.001$) (Figure 4). However, according to a one factor (origin) ANOVA test, no
286 differences were noticed in the efficacy of isolates belonging to the *Burkholderia* strains whatever their
287 origin ($p = 0.56$) (Figure 5).

288

289 4. Discussion

290 We hypothesized that nutrient availability in soils impacts the distribution and the efficacy of the
291 mineral weathering bacterial communities. To test this hypothesis, we settled an experimental oak
292 plantation in a nutrient-poor acidic forest where we performed a relative short-term dolomie amendment.
293 We analysed the soil characteristics as well as the taxonomic belonging and the phosphorous

Table 2 : Taxonomic distribution of bacterial isolates according to their origin. The partial 16S rDNA gene sequences of the bacterial isolates were identified with the BLAST software of NCBI. A significant enrichment of *Burkholderia* and *Arthrobacter* genera and a decrease of the *Paenibacillus* genus in the rhizosphere compared to the surrounding bulk soil were observed, according to a χ^2 analysis ($p < 0.0001$). No significant differences were found in the taxonomical structure in the amended or non-amended treatments according to a χ^2 analysis ($p = 0.89$).

Genus	LS	NLS	LR	NLR
<i>Arthrobacter</i>	3	3	0	7
<i>Bacillus</i>	12	1	1	2
<i>Burkholderia</i>	7	9	27	22
<i>Collimonas</i>	2	2	3	4
<i>Dyella</i>	3	0	1	0
<i>Herbaspirillum</i>	0	0	1	0
<i>Leifsonia</i>	2	2	0	0
<i>Mesorhizobium</i>	2	0	0	1
<i>Microbacterium</i>	1	1	0	1
<i>Mycobacterium</i>	0	1	0	0
<i>Paenibacillus</i>	11	9	3	3
<i>Pseudomonas</i>	1	1	2	1
<i>Rhodanobacter</i>	0	2	1	1
<i>Rhodococcus</i>	0	0	1	0
<i>Sphingobacteriaceae</i>	0	0	1	0
<i>Sphingomonadaceae</i>	0	1	0	0
<i>Streptomyces</i>	0	0	2	1
<i>Variovorax</i>	0	6	6	2

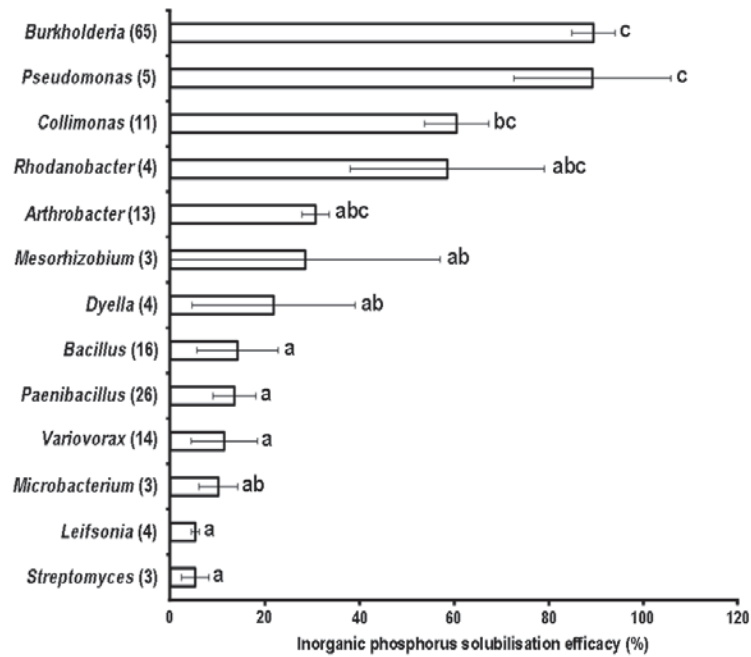


Figure 4 : Relationship between the relative efficacy to solubilise inorganic phosphorus and the genus belonging of the bacterial strains. A total of 176 bacterial isolates were identified based on their 16s rDNA sequence and tested for their ability to solubilise inorganic phosphorus. Bars represent the meant amount of inorganic phosphorus solubilised and expressed as a percentage of the reference strain *Burkholderia glathei* PML1(12) for which the efficacy to solubilise phosphorous is considered as 100%. The number of bacterial strains isolated per genus is presented between brackets. For the genera with a minimum of three bacterial strains identified, one factor (genus) ANOVA test was performed ($p=0.001$). Bars associated with the same letters were not significantly different.

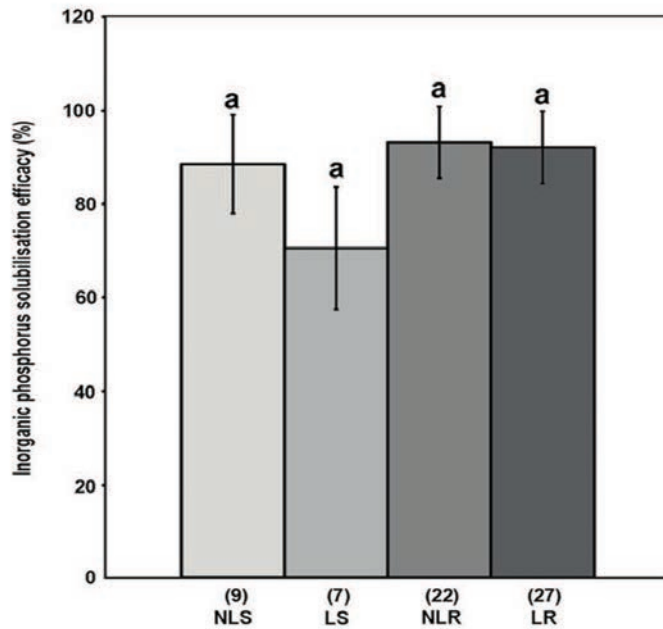


Figure 5 : Comparison of the phosphorous solubilisation efficacy of isolates belonging to the *Burkholderia* genus in function of their origin. Bars represented the meant amount of inorganic phosphorus solubilised expressed as a percentage of the reference strain *Burkholderia glathei* PML1(12) for which the efficacy to solubilise phosphorous is considered as 100%. The number of bacterial strains isolated for each origin was presented between brackets. One factor (origin) ANOVA test was performed ($p=0.56$). Bars associated with the same letters were not significantly different. (NLS : non amended soil, NLR: non-amended rhizospher, LS: amended soil, LR: amened rhizosphere).

294 solubilisation potential of the 176 bacterial strains we isolated from the bulk soil and the oak rhizosphere
295 of amended or non-amended treatments.

296 The dolomie supply modified the expected soil characteristics only, such as the pH and the calcium
297 and magnesium contents. This allows us to claim that the modifications of the functional and/or
298 taxonomical structure of the bacterial communities highlighted in the present study resulted from the
299 dolomie supply. Such effects on soil pH and Ca and Mg contents have already been observed after a
300 dolomie supply in nutrient-poor soils (Kreutzer, 1995 ; Rosberg *et al.*, 2006 ; Saarsalmi *et al.*, 2011).
301 Moreover, the increase of soil pH and Ca and Mg contents improve the base saturation, increasing by
302 this way nutrient availability (Kreutzer, 1995 ; Rosberg *et al.*, 2006).

303 Previous studies have already reported a shift in the functional structure of microbial communities
304 due to the direct effect of mineral amendment (Kan *et al.*, 2004 ; Rangel-Castro *et al.*, 2005 ; Kennedy
305 *et al.*, 2004 ; Backman *et al.*, 2003), but very few have monitored the mineral weathering bacterial
306 communities. In the present study we show for the first time that three years after a dolomie supply, the
307 proportion of efficient mineral weathering bacterial isolates is significantly higher in the non-amended
308 forest soil than in the amended one. Previous field experiments have revealed that application of
309 mineral amendment modified the microbial activity (Kan *et al.*, 2004 ; Kennedy *et al.*, 2004 ; Neale *et al.*,
310 1997) suggesting a modification in the functional structure of microbial communities. Indeed,
311 experiments showed that a dolomie supply increased the proportion of ammonia-oxidizing bacteria in
312 grassland (Gray *et al.*, 2003) or acidic forest soil (Backman *et al.*, 2003). In the same way, Rangel-
313 Castro *et al.* (2005) observed an increase in the bacterial communities able to metabolized root
314 exudates in an upland soil after a dolomie supply.

315 Data from the literature suggest that the impact of a mineral amendment on the functional structure
316 of the soil bacterial communities can evolve along time. Indeed, using a DGGE method Carnol *et al.*
317 (2002) observed that the increase in the nitrification response after 18 months of a dolomie supply was
318 not related to a detectable shift in the ammonia-oxidizers community but to an increase of the
319 nitrification activity. In contrast, using SSCP and DGGE analyses, Backman *et al.* (2003) revealed an
320 increase of the density and the genetic diversity in the ammonia-oxidizing bacterial community 6 years
321 after a dolomie supply. In the present study we showed that three-year after the dolomie supply, the
322 amended soil plots harboured less efficient mineral weathering bacterial isolates than the non-amended
323 ones. These results contrast with those of Uroz *et al.* (2011) who highlighted that 30 years after a
324 $\text{CaCO}_3\text{-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$ supply in a nutrient-poor forest ecosystem, the mineral weathering bacterial isolates
325 sampled in the amended soil plots were more efficient and more abundant than those sampled in the
326 non-amended ones. The apparent discrepancy between these two studies supports the time variation of
327 the mineral amendment effect mentioned above. Important nutritive cations such as K^{2+} and Na^{2+} were

328 proved to decrease in the soil after a mineral amendment (Tyler and Olsson, 2001). Moreover soil
329 analyses and tree growth measurements have revealed that, on the long term, mineral amendment
330 induced secondary deficiencies, due to an intensification of the nutrient uptake by the trees (Uroz *et al.*,
331 2011b ; Elhani *et al.*, 2005). Consequently, Uroz *et al.* (2011) explained the distribution of the mineral
332 weathering bacterial communities they observed by a decrease of the nutrient bioavailability in the
333 forest soil, which was indirectly induced by the promoted tree growth along the past 30 years since the
334 mineral supply. The dolomie effect observed in the present study is in contrast directly linked to the
335 mineral amendment: the proportion of efficient mineral weathering bacterial isolates is higher in the non-
336 amended plots ie in the nutrient-poor environment.

337 Interestingly, bacterial strains belonging to the genera *Burkholderia* and *Collimonas* were
338 characterized by their efficacy to weather minerals. Such a result supports previous studies (Leveau *et*
339 *al.*, 2010; Uroz *et al.*, 2007; 2009b, Collignon *et al.*, 2011) and reinforces the status of these genera as
340 bioindicators of the mineral weathering potential of forest soil bacterial communities (Uroz *et al.*, 2011a).
341 Aside from this functional structuration, no taxonomic modification of the structure of the bacterial
342 communities was observed in the amended soil compared to the non-amended one. Nevertheless, few
343 studies have shown a modification of the taxonomical structure of bacterial communities after mineral
344 amendments. Notably, an increase in the Gram-negative bacteria had been observed after several
345 decades of a mineral fertilizer amendment (NPK) in a crop soil (Marschner *et al.*, 2003). Same
346 observations have been done in an acidic forest soil after eight years of a dolomie supply (Clivot *et al.*,
347 2011). In addition, Sridevi *et al.* (2011) highlight a decrease in the bacterial diversity seven years after a
348 Ca-amendment in a forest soil. Once again, the short-term effect of our study could be an explanation of
349 our contrasted results. However, no taxonomical differences between amended and non-amended plots
350 were observed even after 30 years in a similar forest site (Uroz *et al.*, 2011).

351 Aside from the direct effect of mineral amendment on the microbial communities through
352 modification of the soil properties, the dolomie supply may indirectly affect the soil microbial
353 communities through modification of the plant physiology. In this sense, many studies investigating the
354 microbial activity in mineral amended or non-amended conditions through PLFA, Triphenylformazan
355 dehydrogenase activity, measure of ¹³C assimilation or BIOLOG® Ecoplates approaches (Pettersson and
356 Baath 2003 ; Rangel-Castro *et al.*, 2005 ; Rooney and Clipson, 2009 ; Xue *et al.*, 2010) have revealed
357 an increase of the soil microbial activity consecutively to a mineral amendment. In our study, microbial
358 communities from the amended plots were characterized by a significantly higher ability to metabolize L-
359 asparagin, an amino acid known as a root exudate (Lea *et al.*, 2006), compared to the communities
360 from the non-amended plots. A link between mineral amendment, root exudation and activity of the soil
361 microbial communities has already been highlighted by Rangel-Castro *et al.* (2005) and Xue *et al.*

362 (2010). Notably using a stable isotope probing approach, Rangel-Castro *et al.* (2005) demonstrated an
363 increase of the levels of carbon in plant biomass in amended conditions as well as a better assimilation
364 of root exudates by microbial communities. Moreover using BIOLOG® Ecoplates, Xue *et al.* (2010)
365 revealed that a CaCO₃ application stimulates the utilization of root exudates such as asparagin by soil
366 microbial communities. Altogether, these results suggest that a mineral amendment can have an
367 indirect plant effect on the soil microbial communities, through an intensification of root exudates
368 production.

369 The enrichment of mineral weathering bacterial communities was already reported in the rhizosphere
370 of plants such as cactus, mangrove tree, desert plants and diverse tree species like pine, spruce, oak or
371 beech (Puente *et al.*, 2004 ; Vazquez *et al.*, 2000 ; Goldstein *et al.*, 1999 ; Uroz *et al.*, 2007 ; Calvaruso
372 *et al.*, 2006, 2007 ; Leyval and Berthelin, 1991 ; Illmer and Schinner, 1995). Our study performed on 8-
373 year old oaks corroborate these results, notably those of Calvaruso *et al.* (2007) obtained on 30-year
374 old oak trees planted on the same forest experimental of Breuil-Chenue. Interestingly, we showed no
375 significant impact of the dolomie supply neither on the weathering efficacy of the rhizosphere bacterial
376 isolates nor on the proportion of efficient mineral weathering bacterial isolates in the rhizosphere. These
377 results could be explained by at least three hypotheses. First of all, the augmentation of root exudates
378 could lead to an increase of bacteria through the carbon source availability, reinforcing the rhizosphere
379 selectivity. Secondly, the plant metabolism speeding up through the nutriment supply (Uroz *et al.*, 2011)
380 could lead to a local nutrient deficiencies around the roots and consequently, mineral weathering
381 bacteria were still essential for the plant nutrition. Another hypothesis could be that mineral weathering
382 bacteria could play another essential role for the plant. More studies had to be done to understand this
383 phenomenon. However, these results suggest that trees in the time course of their development select
384 efficient mineral weathering bacterial communities to potentially improve their growth and nutrition.

385

386 **5. Conclusion**

387 In conclusion, our results demonstrated that three years after a mineral amendment, modifications
388 of the soil characteristics such as pH and nutrient bioavailability were still visible. The tree plantation
389 approach developed in this study also highlighted modifications of the functional potentials of the soil
390 microbial communities. Indeed the soil microbial communities of the amended treatment appeared
391 significantly more efficient to metabolize L-asparagin than those from the non-amended treatment. On
392 the contrary, bacterial communities isolated from the non-amended soil presented a better mineral
393 weathering potential than those coming from the amended soil. Together, these results suggest an
394 adaptation of the microbial communities to the soil characteristics, such as the nutrient bioavailability.
395 However, if the mineral amendment practice seems to restore soil fertility in the short-term, another

396 study revealed that in the long-term it could cause secondary deficiencies (Uroz *et al.*, 2011). To avoid
397 apparition on the long-term of these secondary deficiencies, Aarnio *et al.* (2003) suggested replacing
398 rock powder amendments by less weatherable minerals such as apatite or biotite. These minerals may
399 release more regularly their nutritive content without generating nutrient deficiencies or perturbations of
400 the soil bacterial communities (Aarnio *et al.*, 2003). However further investigations will have to be done
401 to monitor the long-term impact of such mineral amendments on the soil characteristics and the mineral
402 weathering bacterial communities.

403

404 **Acknowledgments**

405 This work was funded by a grant from IFR110 'Ecosystèmes Forestiers, Agroressources, Bioprocédés
406 et Alimentation', the "Lorraine" region and the INRA (Institut National de la Recherche Agronomique)
407 Center of Nancy. We thank Bruno Simon and François Rineau for technical assistance.

408

409

410

411 **References**

- 412 Aarnio, T., Rätty, M., Martikainen, P.J., 2003. Long-term availability of nutrients in forest soil derived
413 from fast- and slow-release fertilizers. *Plant and Soil* 252, 227-239.
- 414 Bäckman, J.S.K., Hermansson, A., Tebbe, C.C., Lindgren, P.E., 2003. Liming induces growth of a
415 diverse flora of ammonia-oxidising bacteria in acid spruce forest soil as determined by SSCP and
416 DGGE. *Soil Biology & Biochemistry* 35, 1337-1347.
- 417 Barker W., Welch S., Banfield J., 1997. Biogeochemical weathering of silicate minerals. In: Banfield JF,
418 Nealson KH ed. *Geomicrobiology, Interactions between microbes and minerals*. Mineralogical
419 Society of America, Washington D.C, pp. 391-428.
- 420 Calvaruso C., Turpault M.P., Frey-Klett P., 2006. Root-Associated bacteria contribute to mineral
421 weathering and to mineral nutrition in trees, a budgeting analysis. *Applied Environmental*
422 *Microbiology* 72, 1258-1266.
- 423 Calvaruso C., Turpault M.P., Leclerc E., Ranger J., Garbaye J., Uroz S., Frey-Klett P., 2010. Forest
424 trees influence distribution of the mineral weathering bacterial communities from the scleroderma
425 citrinum mycorrhizosphere. *Applied Environmental Microbiology* 76, 4780-4787.
- 426 Carnol, M., Kowalchuk, G.A., de Boer, W., 2002. *Nitrosomonas europaea*-like bacteria detected as the
427 dominant β -subclass *Proteobacteria* ammonia oxidisers in reference and limed acid forest soils. *Soil*
428 *Biology and Biochemistry* 34, 1047-1050.
- 429 Collignon C., Uroz S., Turpault M.P., Frey-Klett P., 2011. Seasons differently impact the structure of

430 mineral weathering bacterial communities in beech and spruce stands. *Soil Biol Biochem* in press.

431 Edwards U., Rogall T., Blocker H., Emde M., Bottger E.C., 1989. Isolation and direct complete nucleotid
432 détermination of entire genes. Characterisation of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic*
433 *Acids Res* 17, 7843-7853.

434 Elhani S., Guehl JM., Nys C., Picard JF., Dupoey JL. 2005. Impact of fertilization on tree-ring $\delta^{15}\text{N}$ and
435 $\delta^{13}\text{C}$ in beech stands: a retrospective analysis. *Tree Physiology* 25, 1437-1446.

436 Frey-Klett P., Chavatte M., Clause M.L., Courier S., Le Roux C., Raaijmakers J., Martinotti M.G.,
437 Pierrat J.C., Garbaye J., 2005. Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere
438 fluorescent pseudomonads. *New phytologist* 165 , 317-328.

439 Gadd G.M., 2007. Geomycology , biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and
440 radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research* 3, 3-49.

441 Goldstein, A.H., Braverman, K., Osorio, N., 1999. Evidence for mutualism between a plant growing in a
442 phosphate-limited desert environment and a mineral phosphate solubilizing MPS rhizobacterium.
443 *FEMS Microbiology Ecology* 30, 295-300.

444 Gomez E., Ferreras L., Toresani S., 2006. Soil bacterial functional diversity as influenced by organic
445 amendment application. *Bioresource Technology* 97 , 1484-1489.

446 Gray N.D., Hastings R.C., Sheppard S.K., Loughnane P., Lloyd D., McCarthy A.J., Head I.M., 2003
447 Effects of soil improvement treatments on bacterial community structure and soil processes in an
448 upland grassland soil. *FEMS Microbiology Ecology* 46 , 11-22.

449 Illmer, P., Schinner, F., 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms.
450 *Soil Biology and Biochemistry* 273, 257-263.

451 Kan, J., Wang, Y., Obratsova, A., Rosen, G., Leather, J., Scheckel, K.G., Neelson, K.H., Arias-Thode,
452 Y.M., 2011 Marine microbial communti response to inorganic and organic sediment amendments in
453 laboratory mesocosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1931-1941.

454 Kreutzer, K., 1995. Effects of forest liming on soil processes. *Plant and Soil* 168-169, 447-470.

455 Lane DJ., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow ed. *Nucleic acid*
456 *techniques in bacterial systematics*. Joh Wiley and Sons , Chichester, United Kingdom, pp 115-176.

457 Lea, P.J., Sodek, L., Parry, M.A.J., Shewry, P.R., Halford, N.G., 2006. Asparagine in plants. *Annals of*
458 *Applied Biology* 150, 1-26.

459 Leveau, J.H.J., Uroz, S., de Boer, W., 2010. The bacterial genus *Collimonas*, mycophagy, weathering
460 and other adaptive solutions to life in oligotrophic soil environments. *Environmental Microbiology* 12,
461 281-292.

462 Leyval C., Berthelin J., 1991. Weathering of a mica by roots and rhizospheric micro-organisms of pine.
463 *Soil Sci Soc Am J* 55,1009-1016.

464 Likens, G.E., Borman, F.H., Pierce, R.S., Eaton, J.S., Johnson, N.M., 1977. Biogeochemistry of a forest
465 ecosystem. Springer, New York.

466 Mareschal L., 2008. Effet des substitutions d'essences forestières sur l'évolution des sols et de leur
467 mineralogie. PhD Thesis. Université Nancy Henri Poincaré.

468 Mareschal L., Bonnaud P., Turpault M.P., Ranger J., 2010. Impact of common European tree species
469 on the chemical and physiochemical properties of fine earth, an unusual pattern. *Eur J Soil Sci* 61,
470 14-23.

471 Marschner P., Kandeler E., Marschner B., 2003. Structure and function of the soil microbial community
472 in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biology and Biochemistry* 35 , 453-461.

473 Neale, S.P., Shah, Z., Adams, W.A., 1997. Changes in microbial biomass and nitrogen turnover in
474 acidic organic soils following liming. *Soil Biology and Biochemistry* 29/10, 1463-1474.

475 Petersson, M., Baath, E., 2003. Temperature-dependant changes in the soil bacterial community in
476 limed and unlimed soil. *FEMS Microbiology Ecology* 45, 13-21.

477 Puente M.E., Bashan Y., Lebsky V.K., 2004. Microbial populations and activities in the rhizosphere of
478 rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biol* 6,
479 629-642.

480 Rangel-Castro, I., Killham, K., Ostle, N., Nicol, G.W., Anderson, I.C., Scrimgeour, C.M., Ineson, P.,
481 Meharg, A., Prosser J.I., 2005. Stable isotope probing analysis of the influence of liming on root
482 exudate utilization by soil microorganisms. *Environmental Microbiology* 76, 828-838.

483 Ranger, J., Turpault, M.P., 1999. Input-output nutrient budget as a diagnostic tool for sustainable forest
484 management. *Forest ecology Management* 122, 139-154.

485 Rooney, D.C., Clipson, N.J.W., 2009. Phosphate addition and plant species alters microbial community
486 structure in acidic upland grassland soil. *Microbial Ecology* 57, 4-13.

487 Rosberg, I., Frank, J., Stuanes, A.O., 2006. Effect of liming and fertilization on tree growth and nutrient
488 cycling in a Scots pine ecosystem in Norway. *Forest Ecology and Management* 237, 191-207.

489 Saarsalmi, A., Tamminen, P., Kukkola, M., Levula, T., 2011. Effects of liming on chemical properties of
490 soil, needle nutrition and growth of Scots pine transplants. *Forest Ecology and Management* 262,
491 278-285.

492 Sridevi G., Minocha R., Turlapati S.A., Goldfarb K.C., Brodie E.L., Tisa L.S., Minocha S., 2011. Soil
493 bacterial communities of a calcium-supplemented and a reference watershed at the Hubbard Brook
494 Experimental Forest HBEF, New Hampshire, USA. *FEMS Microbiology Ecology* 79 , 728-740.

495 Thompson, J.D., Higgins, D.J., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive
496 multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and
497 weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.

498 Turpault M.P., Nys C., Calvaruso C., 2009. Rhizosphere impact on the dissolution of test minerals in a
499 forest ecosystem. *Geoderma* 153, 147-154.

500 Tyler G., Olsson T., 2001. Plant uptake of major and minor mineral elements as influenced by soil
501 acidity and liming. *Plant and Soil* 230 , 307-321.

502 Uroz S., Calvaruso C., Turpault M.P., Pierrat J.C., Mustin C., Frey-Klett P., 2007. Effect of the
503 mycorrhizosphere on the genotypic and metabolic diversity of the bacterial communities involved in
504 mineral weathering in a forest soil. *Appl Environ Microb* 73, 3019-3027.

505 Uroz S., Calvaruso C., Turpault M.P., Frey-Klett P., 2009a. The microbial weathering of soil minerals,
506 ecology, actors and mechanisms. *Trends Microbiol* 17, 378-387.

507 Uroz S., Calvaruso C., Turpault M.P., Sarniguet A., de Boer W., Leveau J.H.J., Frey-Klett, P. ,2009b.
508 Efficient mineral weathering is a distinctive functional trait of the bacterial genus *Collimonas*. *Soil*
509 *Biol Biochem* 41, 2178-2186.

510 Uroz S., Oger P., Lepleux C., Collignon C., Frey-Klett P., Turpault M.P., 2011a. Bacterial weathering
511 and its contribution to nutrient cycling in temperate forest ecosystems. *Res Microbiol* 162, 820-831.

512 Uroz S., Turpault M.P., Van Scholl L., Palin B., Frey-Klett P., 2011b Long term impact of mineral
513 amendment on the distribution of the mineral weathering associated bacterial communities from the
514 beech *Scleroderma citrinum* ecyomycorrhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 2275-2282.

515 Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M.E., Lopez-Cortes, A., Bashan, Y., 2000. Phosphate-solubilizing
516 microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol*
517 *Fertil Soils* 30, 460-468.

518 Xue, D., Huang, X., Yao, H., Huang, C., 2010. Effect of lime application on microbial community in
519 acidic tea orchard soils in comparison with those in wasteland and forest soils. *Journal of*
520 *Environmental Sciences* 22 8, 1253-1260.

521

522

523

6. Résultats supplémentaires

Au départ, les plants de chênes étaient mycorhizés avec une souche du champignon *Scleroderma citrinum* isolée sur le site de Breuil, en vue d'analyser l'impact de l'amendement minéral sur les communautés bactériennes de la mycorhizosphère en plus de celles de la rhizosphère et du sol environnant. L'odeur particulière des mycorhizes, généralement retrouvées directement sous les carpophores de ce champignon, le rend facilement reconnaissable permettant ainsi un échantillonnage plus aisé. Malheureusement, lors du prélèvement, seulement deux chênes présentaient des carpophores et des mycorhizes de *S. citrinum* et cinq chênes montraient des mycorhizes non identifiables. Le choix du compartiment mycorhizosphérique n'a donc pas été retenu pour cette étude, privilégiant une approche plus globale, basée sur l'étude du compartiment rhizosphérique. Toutefois, **ces mycorhizes ont été prélevées et soumises à des tests enzymatiques** (protocole n°18) (Identification des morphotypes et tests enzymatiques réalisés par JL Churin). De plus, en complément des microplaques BIOLOG®, ces tests enzymatiques ont également été réalisés sur des suspensions de sol. Dans cette partie, je m'attache à présenter les résultats obtenus pour ces tests.

6.1. Résultats

Les résultats de ces tests enzymatiques sont présentés dans la figure 3.2. La comparaison des **activités enzymatiques des mycorhizes** (tout morphotype confondu) provenant des chênes amendés ou non **montre des différences importantes, bien que non significatives** (dus à une forte variabilité des résultats), et ce, notamment au niveau **des activités phosphatases acides** ($p=0,37$) et **leucine aminopeptidase** ($p=0,23$). En effet, **ces deux activités sont en moyenne plus élevées dans le traitement amendé**. Par ailleurs, concernant **les activités du sol environnant, seules les activités laccase et glucosidase ont pu être exploitées**. Les résultats obtenus pour les autres enzymes testées se sont révélés inexploitable (nulles ou négatives). La comparaison de ces deux activités montre **une légère augmentation non significative de l'activité glucosidase dans les sols amendés et à l'inverse, une diminution de l'activité des laccases dans ces mêmes sols**.

6.2. Interprétation

La phosphatase et la leucine aminopeptidase sont deux enzymes respectivement impliquées dans la dégradation du phosphate organique et des protéines. L'augmentation de ces deux activités après un amendement minéral est synonyme de l'augmentation des exsudats racinaires et/ou de la matière

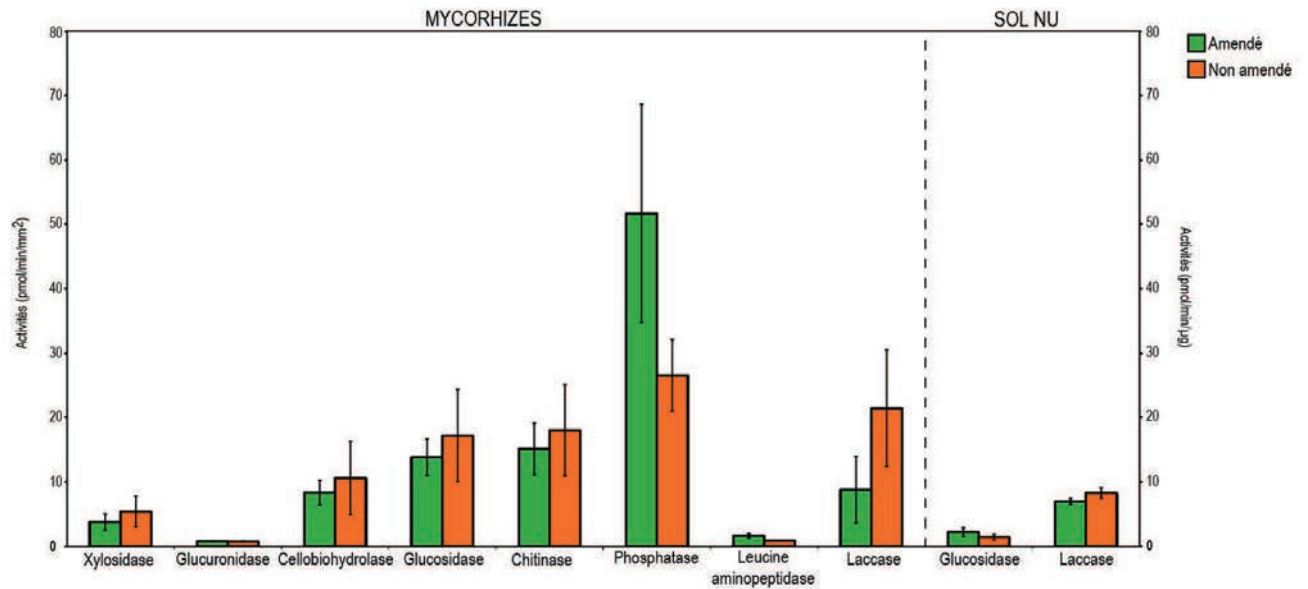


Figure 3.2 : Activités enzymatiques.

Les histogrammes représentent l'activité enzymatique mesurée pour les mycorhizes (tout morphotype confondu) ou le sol nu en condition amendée ou non. Les activités des mycorhizes sont exprimées en quantité de substrat (pmol) par unité de temps (min) et de surface projeté (mm²) tandis que celles du sol nu sont exprimés en pmol par min par masse de sol (μg). Les analyses statistiques réalisées sur ces activités n'ont montrées aucune différence significative.

organique suggérant une meilleure nutrition de la plante. De plus, les tests effectués sur les solutions de sols montrent également une augmentation de la dégradation des sucres (activité glucosidase) telle que la cellulose (polymère de glucose) dans les sols amendés. Ces observations suggèrent l'hypothèse suivante: après un amendement minéral, la plante, se trouvant en condition non limitante, prélève et assimile d'autant plus de nutriments augmentant dans le même temps sa production de matière organique. Ceci stimule l'activité d'enzymes de dégradation telles que les glucosidases, les leucines peptidases ou encore les phosphatases. Ces résultats sont en adéquation avec ceux de Rineau et Garbaye., (2009) démontrant cette fois pour des apex d'ectomycorhizes une augmentation globale de ces mêmes activités enzymatiques, 16 ans après un amendement minéral. Ces résultats peuvent également s'expliquer par une stimulation de la densité microbienne par l'amendement minéral précédemment observée dans d'autres études (Chagnon, 2001 ; Kennedy, 2004). Tout ces résultats suggèrent donc un impact de l'amendement minéral non seulement sur la nutrition de la plante mais aussi sur l'activité microbienne du sol en modifiant la structure taxonomique de ces communautés (Garau *et al.*, 2007 ; Marschner *et al.*, 2003) et en stimulant ou en diminuant certaines fonctions telles que les activités enzymatiques (Rineau et Garbaye, 2009 ; Xue *et al.*, 2010).

7. Conclusion

Cette étude réalisée dans le cadre de ma thèse a permis de générer trois résultats importants pour la compréhension du rôle des communautés bactériennes du sol dans le fonctionnement des écosystèmes forestiers.

Tout d'abord, ces travaux ont permis de confirmer que la **disponibilité des nutriments impacte la distribution des communautés bactériennes potentiellement altérantes et leur efficacité**. Ces résultats suggèrent qu'en condition de « stress nutritif », les communautés bactériennes sélectionnées sont plus efficaces pour accéder aux ressources nutritives piégées dans les minéraux. Le « stress nutritif » pourrait donc potentiellement réguler le(s) mécanisme(s) responsables de l'altération minérale chez les bactéries. Cette hypothèse devra bien sûr être confirmée par d'autres études.

Parallèlement, cette étude a permis de démontrer pour la première fois chez de **jeunes arbres (8 ans)**, la sélection de communautés bactériennes cultivables capables d'altérer les minéraux au niveau de leur système racinaire, suggérant que la sélection par la rhizosphère de ces communautés bactériennes spécifiques se fait assez tôt dans le développement de l'arbre.

Ce travail de thèse a également corroborer de précédentes études (Calvaruso *et al.* 2007 ; Uroz *et al.*, 2007) **démontrant la capacité d'altération de certains genres bactériens tels que *Burkholderia* et *Collimonas*** (Calvaruso *et al.* 2007 ; Uroz *et al.*, 2007), renforçant ainsi leur rôle de **biomarqueurs de l'altération minérale** en l'absence de gènes connus. Effectivement, nous ignorons encore les déterminants génétiques bactériens de cette fonction altération ainsi que le ou les mécanisme(s) y étant associé(s). Plusieurs études ont cependant identifié quelques mécanismes d'actions pouvant intervenir dans l'altération minérale microbienne tels que la sécrétion de sidérophores, d'agents chélateurs, d'acides organiques ou encore l'intervention de mécanismes d'oxydo-réduction (Newman, 2001 ; Hernandez *et al.*, 2004 ; Welch *et al.*, 2002 ; Blake et Walter, 1996). En parallèle de cette étude, j'ai engagé des travaux pour identifier et caractériser les gènes bactériens impliqués dans le(s) mécanisme(s) de l'altération minérale chez les bactéries. Cette étude fait l'objet du troisième chapitre de ma thèse.

CHAPITRE 4 :
CONCLUSIONS – PERSPECTIVES

1. Synthèse des résultats

Cette étude avait pour objectif de caractériser les acteurs bactériens de l'altération minérale dans le contexte de la disponibilité en nutriments dans les écosystèmes forestiers. Pour mener à bien cette étude, j'ai utilisé une approche multidisciplinaire, combinant écologie et géochimie, qui a permis :

- D'identifier taxonomiquement et fonctionnellement les communautés bactériennes associées à la surface des minéraux dans un sol forestier pauvre en nutriments (site de Breuil-Chenue).
- De confirmer le concept de la minéralosphère (un habitat à considérer).
- D'établir une corrélation significative et positive entre l'abondance de séquences 16S rRNA assignées au phylum des *β -proteobacteria* et l'altération globale de l'apatite.
- De mettre en évidence que les communautés bactériennes associées à la surface des minéraux étaient capables d'altérer les minéraux et se caractérisaient plutôt par un métabolisme oligotrophe, très différent de celui des communautés bactériennes de la mycorhizosphère (un habitat plus riche).
- De démontrer que la disponibilité en nutriments (testée *via* un amendement minéral) dans un sol forestier pauvre en nutriments inorganiques impactait la structuration des communautés bactériennes du sol capables d'altérer les minéraux.

Au delà de ces résultats, cette étude est, je pense, une illustration de l'importance de l'approche cultivable pour étudier une fonction. Dans le contexte actuel, basé essentiellement sur le moléculaire et le 'tout homologie', il reste de nombreux domaines encore inconnus, et la fonction altération en est un (Uroz et Frey-Klett, 2011). Les travaux développés durant ma thèse et associant approches cultivable, non cultivable, laboratoire et terrain, écologie microbienne et biogéochimie illustrent bien la nécessité de combiner les approches pour répondre aux questions.

2. Les bactéries appartenant aux genres *Burkholderia* et *Collimonas* : des biomarqueurs de l'altération

Les récentes études réalisées sur la fonction altération des communautés bactériennes dans les sols des écosystèmes forestiers a mis en évidence l'existence de deux genres bactériens possédant un fort potentiel d'altération : *Burkholderia* et *Collimonas* (Calvaruso *et al.*, 2006, 2010 ; Uroz *et al.*, 2007, 2009, 2011 ; Collignon *et al.*, 2011). Cette démonstration a été réalisée notamment sur trois sites forestiers (en France : Sites expérimentaux de Breuil-Chenue et de Fougères ; et en Californie sur un

site côtier) par le laboratoire dans lequel j'ai réalisé ma thèse et plus largement dans d'autres études sur des écosystèmes plus variés. Ces deux genres appartiennent au phylum des *Proteobacteria*, à la sous-classe des β -*proteobacteria* et à la famille des *Burkholderiales*.

A l'heure actuelle, le genre *Burkholderia* compte plusieurs dizaines d'espèces divisées en deux « groupes » : celles pathogènes de l'homme ou de plante (Godoy *et al.*, 2003 ; Holden *et al.*, 2004), et celles non-pathogènes retrouvées en symbiose avec les plantes et/ou dans leur environnement (Payne *et al.*, 2006 ; Izumi *et al.*, 2008 ; Compant *et al.*, 2008 ; Onofre-Lemus *et al.*, 2009). Dans les sols acides, ce sont principalement des espèces en symbiose avec les racines ou avec les champignons mycorhiziens qui sont retrouvées telles que les espèces *fungorum*, *caledonica*, *phenazinium* ou encore *glathiei* (Viillard *et al.*, 1998 ; Coenye *et al.*, 2001 ; Izumi *et al.*, 2010). Néanmoins, le genre *Burkholderia* est surtout étudié dans le cadre médical, car il est à l'origine de nombreuses infections telles que des mélioïdoses (Godoy *et al.*, 2003 ; Norville *et al.*, 2011). A l'inverse, peu d'informations sont disponibles sur les espèces non pathogènes. Cependant, plusieurs études réalisées dans le cadre médical ont démontré, notamment pour les *Burkholderia* de l'espèce *cepacia*, qu'elles étaient capables de produire quatre types de sidérophores (Meyer *et al.*, 1989 ; Rivault *et al.*, 2006) et que ces molécules étaient nécessaires à leur virulence (Meyer *et al.*, 1989 ; Sokol *et al.*, 1999 ; Mossialos *et al.*, 2009). Des *Burkholderia sp.* ont également été retrouvées dans les sols et, notamment dans les rhizosphères de plantes telles que le manguier, l'arachide ou la tomate. Des analyses fonctionnelles en utilisant des milieux CAS et/ou NBRIP (milieu contenant du phosphate inorganique ; Nautiyal, 1999) ont démontré qu'elles produisaient des sidérophores, qu'elles étaient capables de solubiliser le phosphore et de produire divers acides organiques tels que de l'acide acétique, carboxylique, oxalique, malique, lactique, citrique et succinique (Tanaka *et al.*, 2000 ; Caballero-Mellado *et al.*, 2007 ; de los Santos-Villalobos *et al.*, 2012 ; Liu *et al.*, 2012). Bien que les informations dont nous disposons sur le genre *Burkholderia* proviennent essentiellement d'analyses réalisées dans le cadre médical, il n'en reste pas moins que la capacité à produire des sidérophores et des acides organiques de ce genre bactérien pourrait être transposé dans le cadre de l'altération minérale, suggérant ainsi des mécanismes moléculaires pouvant potentiellement être impliqués. Par exemple, les sidérophores produits et impliqués dans la virulence chez *Burkholderia cepacia* (Sokol *et al.*, 1999 ; Rivault *et al.*, 2006) sont peut-être également capables d'altérer les minéraux. De même que les *Burkholderia* (*xenovorans*, *uname*, *tropica*, *cepacia*) isolées du sol pourraient tout aussi bien être efficaces pour altérer les minéraux de part les acides organiques qu'elles sont capables de produire (Tanaka *et al.*, 2000 ; Caballero-Mellado *et al.*, 2007 ; de los Santos-Villalobos *et al.*, 2012). Dans le cadre de ma thèse, j'ai

démontré que les bactéries du genre *Burkholderia* pouvaient coloniser les minéraux et qu'elles étaient capables d'altérer les minéraux.

Concernant les bactéries appartenant au genre *Collimonas*, elles sont principalement retrouvées dans les sols pauvres en nutriments inorganiques, riches en champignon et aussi au niveau des racines des arbres (de Boer *et al.*, 1998a ; Kohlmeier *et al.*, 2005 ; Chow *et al.*, 2002 ; Höppener-Ogawa *et al.*, 2009). Ce genre est un groupe rare et a été initialement isolé d'une dune située sur la côte des Pays-Bas (de Boer, 1998a). Les bactéries du genre *Collimonas* sont capables de dégrader la chitine (de Boer *et al.*, 1999 ; Fritsche *et al.*, 2008), de protéger les plantes contre des champignons phytopathogènes (de Boer *et al.*, 1998a, 1998b), d'extraire des nutriments de champignons encore vivants (mycophagie) (de Boer *et al.*, 2004 ; Höppener-Ogawa *et al.*, 2007) et de dégrader des polluants tels que le pentachlorophénol ou le naphthalène (Wilson *et al.*, 2003 ; Mahmood *et al.*, 2005). Elles sont également connues pour leur capacité à altérer les minéraux. En 2009, Uroz *et al.*, ont testé 45 bactéries appartenant au genre *Collimonas* et provenant de différents environnements tels que des sols de forêts tempérées ou boréales, de la toundra Arctique ou de dune recouvertes d'herbe. Le résultat fort de ces travaux, et qui n'a pas été contredit à ce jour, est que toutes les souches de *Collimonas* testées sont capables d'altérer les minéraux avec une efficacité plus élevée que celle des autres genres bactériens (Uroz *et al.*, 2009). Dans le cadre de ma thèse, ce genre bactérien a été retrouvé par l'approche non cultivable (pyroséquençage) à la surface de l'apatite et son abondance (avec celle des *Burkholderia*) est corrélée avec le taux global d'altération des grains d'apatite. Des souches bactériennes potentiellement altérantes et appartenant à ce genre bactérien ont d'ailleurs été retrouvées à la surface d'un granite provenant du glacier de Damma en Suisse (Lapanje *et al.*, 2012). Ces différentes observations suggèrent que le genre bactérien *Collimonas* est particulièrement adapté aux environnements pauvres en cations nutritifs, et sa capacité à altérer les minéraux (capacité qui semble être un trait fonctionnel du genre) ainsi que sa présence à leur surface le confirme.

Mes travaux de thèse confortent donc l'idée qu'en absence de gènes connus, les genres bactériens *Burkholderia* et *Collimonas* peuvent être considérés comme des bioindicateurs de la présence de la fonction altération par les bactéries, au moins dans les sols des écosystèmes forestiers développés sur des sols acides. L'utilisation du marqueur 16S a néanmoins ses limites, et nécessite un principe de précaution dans les conclusions scientifiques, quand on connaît la diversité spécifique du genre *Burkholderia*.

3. Effet de l'essence forestière sur l'altération des minéraux

L'influence des essences forestières sur la dissolution des minéraux est un phénomène assez connu. Les travaux d'Augusto *et al.* (2000) ont, par exemple, démontré que la dissolution d'un minéral, la labradorite $[\text{Na,Ca}](\text{Al,Si})_4\text{O}_8$, était plus importante sous un peuplement de conifères (pin, épicéa ...) que sous un peuplement de feuillus (chêne, hêtre, ...), ceci étant probablement dû à la physiologie de l'arbre, les conifères acidifiant plus le sol que les feuillus (Turpault *et al.*, 2007 ; Calvaruso *et al.*, 2010). Dans mon étude, l'altération globale de l'apatite est également plus élevée sous le pin Corse et l'épicéa de Norvège (conifères) que sous le hêtre (feuillu), confirmant les précédentes études. Néanmoins, dans mon étude, l'apatite est retrouvée plus altérée sous le taillis sous futaie qui correspond en réalité à la forêt native (mélange d'essences) du site expérimental de Breuil-Chenué (Morvan). Ce peuplement n'a pas été remanié lors de l'installation du site expérimental, et est donc composé de plusieurs essences d'âges variés, en opposition aux autres peuplements monospécifiques installés sur le site expérimental. La différence du taux d'altération global de l'apatite pourrait donc être liée à l'hétérogénéité des essences d'arbres. La forêt mixte entraîne en effet la composition d'une litière différente et dont la dégradation en matière organique sera plus riche en composés acides (H^+ , CO_2) (Grayston *et al.*, 1996 ; Li *et al.*, 2009). De même, les composés rhizosphériques libérés par les racines des arbres, tels que les acides organiques, seront plus variés que dans le sol d'une plantation monospécifique (Grayston *et al.*, 1996 ; Augusto *et al.*, 2000). Tous ces composés, plus ou moins métabolisables par les microorganismes du sol, vont entraîner une structuration différente des communautés bactériennes du sol. Par exemple, sur le site de Breuil-Chenué, une étude *via* une approche par ARISA (automated ribosomal interspacer analysis) a démontré que les communautés bactériennes du sol étaient significativement différentes selon le peuplement d'arbre considéré (forêt native (i.e. taillis sous futaie), chêne, sapin ou épicéa) (Lejon *et al.*, 2005). A titre de comparaison, l'étude de six forêts natives en Autriche a démontré que les sols des forêts de pin étaient composés de bactéries à Gram-positives à forte proportion en G+C ainsi que de β -*proteobacteria* tandis que les forêts composées d'épicéa et de hêtre présentaient une forte proportion d' α -*proteobacteria* et d'*Acidobacteria* (Hackl *et al.*, 2004). D'un point de vue du minéral, une étude récente a démontré que des minéraux enterrés sous deux essences d'arbres différents (hêtre et épicéa) présentaient une structuration taxonomique différente dans les communautés bactériennes associées à leur surface (Uroz *et al.*, 2012). Dans mon étude, cette différence dans la composition des solutions du sol a probablement aussi entraîné la différence de structuration des communautés bactériennes observées à la surface de l'apatite. La surface de l'apatite enterrée sous le taillis sous futaie est dominée par des bactéries appartenant au genre *Collimonas*, connu pour sa capacité à altérer les minéraux, et qui est retrouvé à la surface de l'apatite enterrée sous

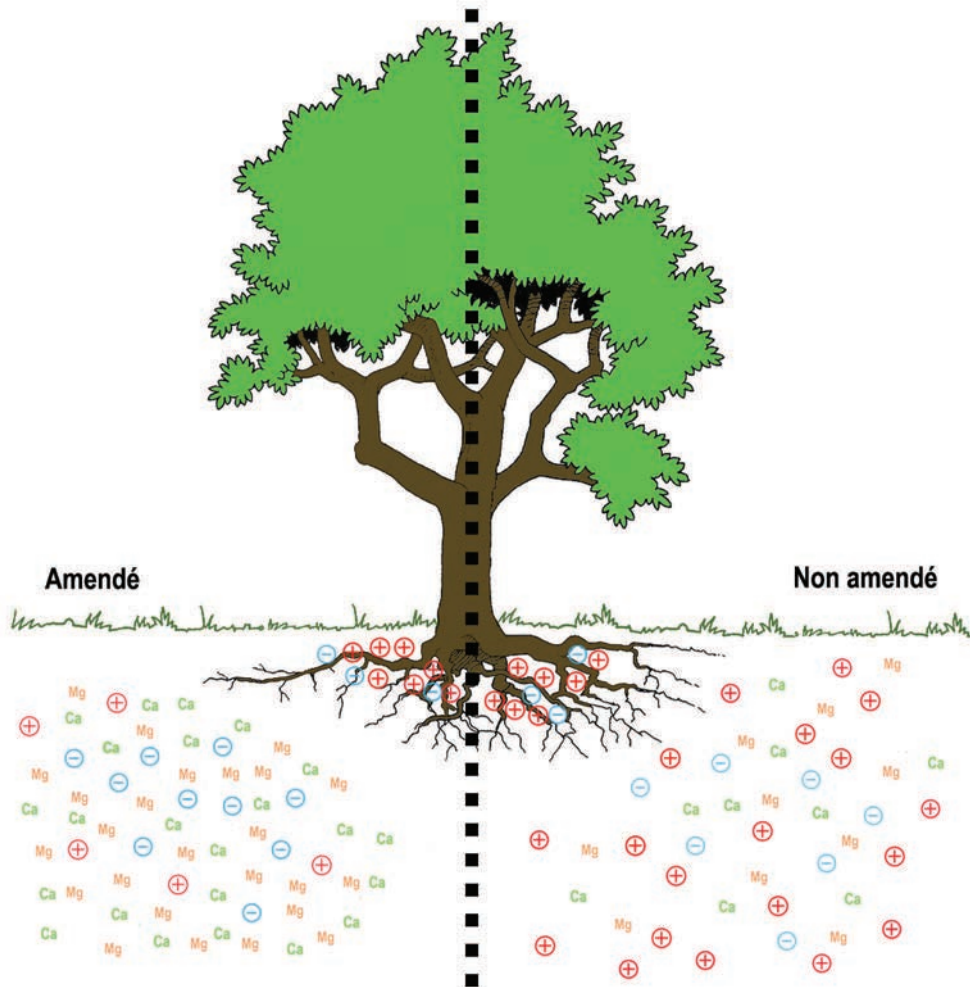


Figure 5.1 : Impact de la disponibilité en nutriments sur la structuration fonctionnelle des communautés bactériennes du sol.

Dans le chapitre 3 de ma thèse, j'ai démontré que les communautés bactériennes du sol amendé avaient un potentiel d'altération plus faible que celles provenant du sol non amendé. Cependant aucune différence n'a été constatée pour les communautés bactériennes de la rhizosphère. Les + rouges représentent les bactéries potentiellement altérantes, les – bleus représentent celles dont le potentiel d'altération est quasi nul.

les autres peuplements. De même, l'abondance de bactéries appartenant au phylum des *β-proteobacteria* est corrélée avec le taux de dissolution de l'apatite selon l'essence d'arbre considérée. En plus d'avoir un effet sur la dissolution du minéral, l'essence forestière aurait donc également un effet sur la composition taxonomique des communautés bactériennes colonisant les minéraux du sol. Ces résultats sont à prendre avec précaution en raison du manque de répétitions et doivent faire l'objet d'autres études afin de confirmer ou infirmer ces conclusions. Néanmoins et à titre de comparaison, l'effet de l'essence forestière sur la structuration fonctionnelle et taxonomique a été démontrée sur le même site expérimental pour des communautés bactériennes provenant de la mycorhizosphère de *Scleroderma citrinum* associée au chêne, au hêtre ou à l'épicéa (Calvaruso *et al.*, 2010). Ces auteurs ont démontré que les communautés bactériennes colonisant la mycorhizosphère du chêne et du hêtre étaient potentiellement plus altérantes que celles retrouvées dans la mycorhizosphère de l'épicéa, suggérant ainsi un effet essence sur la structuration fonctionnelle de ces communautés. Au-delà de l'effet essence, les arbres peuvent également influencer la structure des communautés bactériennes de la rhizosphère selon leurs besoins nutritifs. Collignon *et al.* (2011), ont par exemple, observé que la structuration taxonomique et fonctionnelle des communautés bactériennes de la rhizosphère de hêtre et d'épicéa variait selon la saison, suggérant une influence directe de la physiologie de l'arbre. Ainsi, au-delà du minéral, c'est l'essence des arbres composant la forêt (leur physiologie, exsudats racinaires, composition chimique des litières) qui influencerait la structuration des communautés bactériennes, même à la surface des minéraux.

4. Impact de la disponibilité en nutriments inorganiques

Les différentes études réalisées au sein de mon laboratoire (en microcosme, sur le terrain) ont montré que la disponibilité en nutriments impactait la fonction altération des communautés bactériennes du sol. Les travaux que j'ai réalisés sur cette question sur le dispositif installé sur le site de Breuil-Chenu ont montré que le sol non amendé présentait une plus forte proportion de bactéries ayant la capacité d'altérer les minéraux (Figure 5.1 ; cf. Chapitre 3). Ces résultats sont en relation directe avec les travaux de Uroz *et al.* (2011a). Ces auteurs ont observé qu'après 30 ans, un sol chaulé présentait une plus forte proportion de bactéries potentiellement altérantes qu'un sol non chaulé. Ces résultats ont été expliqués par le fait, qu'à long terme, le chaulage conduit à des carences nutritives (Tyler et Olsson, 2001), suggérant un effet de la disponibilité en nutriments. De même, des expériences *in vitro* en microcosmes ont montré une augmentation significative de la croissance d'un arbre et de la concentration en nutriments issus d'un minéral test, la biotite, en présence d'une souche bactérienne modèle caractérisée par un fort potentiel d'altération, la souche PML1(12) de *Burkholderia glathei*. Cet

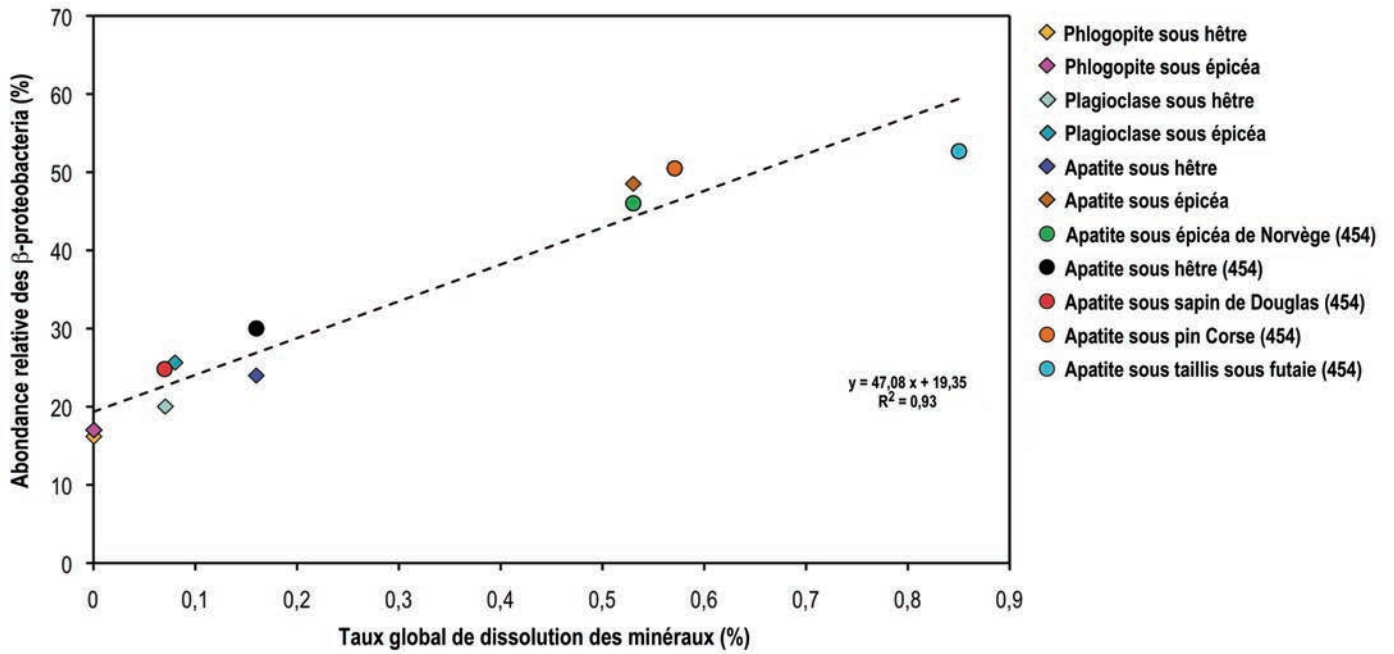


Figure 5.2 : Corrélation entre le taux global de dissolution de minéraux et l'abondance des β -proteobacteria à leur surface.

Les données de l'étude de Uroz et al., 2011 (losanges) obtenues par clonage/séquençage (70 séquences par échantillons), ont été ajoutées à celles de Lepleux et al., 2012 (ronds). Les mêmes échantillons d'apatite sous les peuplements de hêtre et d'épicéa ont servi aux approches clonage/séquençage et 454. Une corrélation positive et significative a été trouvée entre le taux de dissolution des minéraux et l'abondance des β -proteobacteria colonisant leur surface ($y = 47,08x + 19,35$; $R^2 = 0,93$; $p > 0,0001$).

effet n'a été observé qu'en condition carencées, aucune différence significative n'ayant été observée en conditions riches (Calvaruso *et al.*, 2006). Ces résultats ne sont pas sans rappeler les études menées sur la production des sidérophores. En effet, plusieurs études ont démontré que ces molécules chélatrices de fer étaient produites uniquement lorsque le milieu était carencé en fer (Kalinowski *et al.*, 2000 ; Liermann *et al.*, 2000 ; Ams *et al.*, 2002). Quelques études ont également démontré que certaines bactéries rhizosphériques qui ont la capacité de solubiliser le phosphore inorganique, ne le font que lorsque le milieu est carencé en phosphore (Goldstein *et al.*, 1999 ; Buch *et al.*, 2008 ; Crespo *et al.*, 2011). De plus, à l'heure actuelle, la fonction altération de bactéries associées à la surface des minéraux n'a été démontrée que dans des milieux extrêmes supposés pauvres en nutriments comme dans les glaciers (Frey *et al.*, 2010 ; Lapanje *et al.*, 2012), les monuments (Gonzalez *et al.*, 1999 ; Wang *et al.*, 2011) ou les minéraux du sol des écosystèmes forestiers pauvres en nutriments (Uroz *et al.*, 2012 ; Lepleux *et al.*, 2012). Le tout ici est de savoir si la présence de la fonction altération par les communautés bactériennes dans des environnements supposés pauvres en nutriments est un hasard ou si c'est une adaptation développée par ces communautés bactériennes pour survivre à des conditions de vie extrême ou tout du moins dans des conditions limitantes ?

5. Les minéraux : une zone d'échange et un habitat pour les microorganismes

Les minéraux ont longtemps été considérés comme une surface biologiquement inerte, et de ce fait, écartés de toutes les analyses concernant la diversité microbienne des sols (tamisage à 2 mm excluant les particules plus grosses). Il est vrai que la colonisation microbienne des minéraux et des roches a surtout été démontrée dans le cadre d'études d'environnements extrêmes et pauvres en matière organique tels que les déserts, les glaciers, les volcans ou encore les monuments historiques (Kelly *et al.*, 2011 ; Borin *et al.*, 2009 ; Chanal *et al.*, 2006, Garcia de Miguel *et al.*, 1995 ; Wang *et al.*, 2011 ; Frey *et al.*, 2010), mais pas forcément sur des minéraux difficilement altérables. En effet, comme décrit dans l'introduction, les sols acides de nos régions tempérées sont caractérisés par des minéraux qui ont subi des siècles de conditions acides, libérant les éléments nutritifs dans le milieu. Le constat est que les minéraux restants, et qui constituent le réservoir nutritif de ces sols (ex : phyllosilicates), sont plus difficilement altérables, rendant cette problématique particulièrement pertinente d'un point de vue recherche. Dans ce contexte, mon travail de thèse a démontré non seulement que les minéraux du sol étaient colonisés par des communautés bactériennes spécifiques, les *β -proteobacteria*, mais aussi que ces communautés étaient, du moins pour une proportion importante des souches bactériennes cultivables testées, capables d'altérer ces minéraux et de participer ainsi au cycle des nutriments. Une corrélation positive et significative a de plus été observée entre l'abondance des *β -proteobacteria* et le

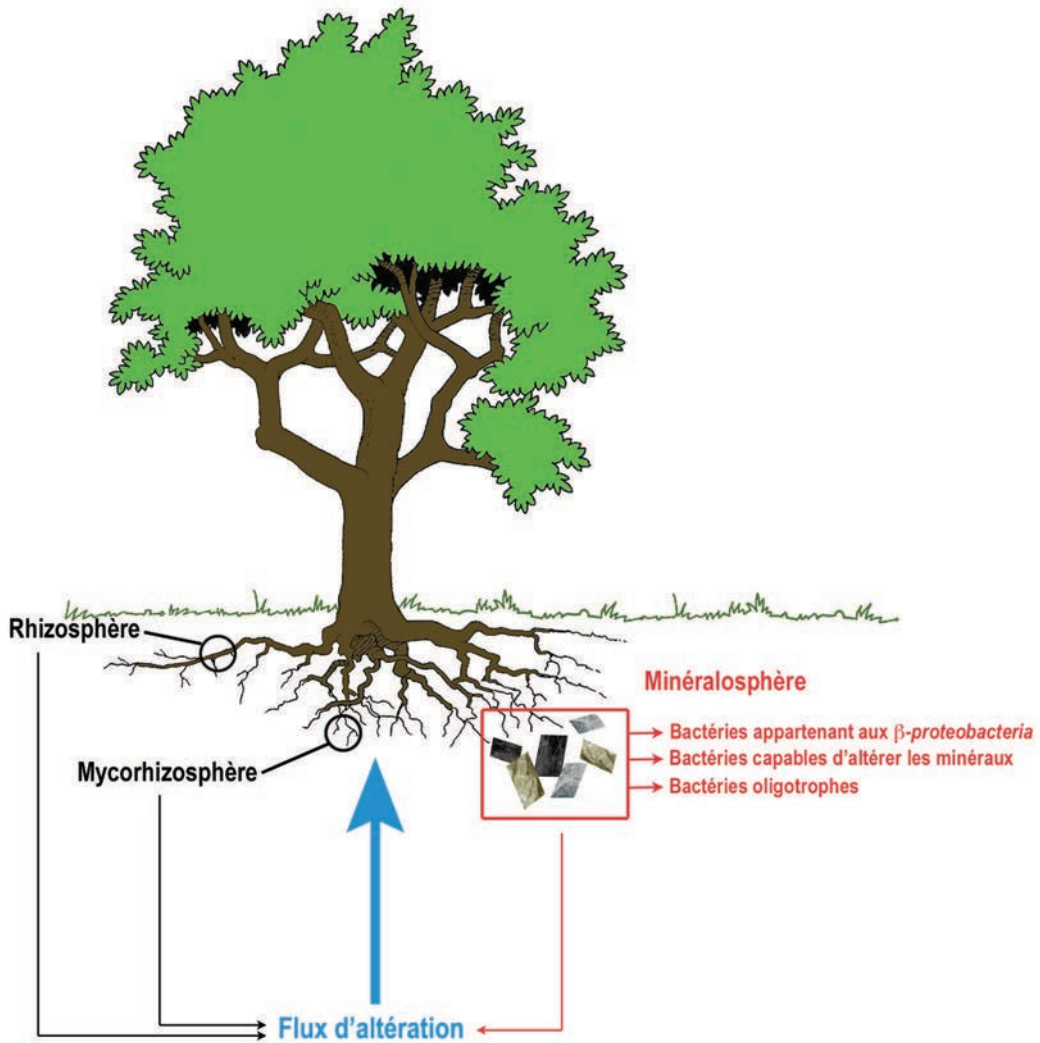


Figure 5.3 : Schéma récapitulatif des niches connues pour leur implication dans l'altération minérale en forêt.

Les communautés bactériennes de la rhizosphère et de la mycorhizosphère sont déjà connues pour leur capacité à altérer les minéraux. Dans le cadre de ma thèse, j'ai démontré l'existence d'une troisième niche, la minéralosphère, colonisée par des bactéries spécifiques, les *β-proteobacteria* dont l'abondance à la surface des minéraux est corrélée avec leur altération. L'approche cultivable a démontré que ces bactéries étaient capables d'altérer les minéraux et qu'elles avaient un profil métabolique plutôt oligotrophe.

taux global d'altération de l'apatite. Ces résultats ont été confrontés à une autre étude réalisée sur le même site expérimental (Uroz *et al.*, 2012) dans laquelle les auteurs ont comparé, par une approche de clonage/séquençage, les communautés bactériennes colonisant trois minéraux différents (apatite, phlogopite et plagioclase) enterrés sous deux essences d'arbres (hêtre et épicéa). L'ajout de leurs données à celles obtenues dans le cadre de ma thèse conforte l'hypothèse selon laquelle l'altération globale des minéraux du sol serait corrélée avec la colonisation de leur surface par des communautés bactériennes appartenant au phylum des *β -proteobacteria* ($p > 0,0001$) (Figure 5.2). D'autres études ont également démontré que plus un minéral est altéré, plus sa richesse bactérienne est élevée (Santelli *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2011), suggérant l'implication des communautés bactériennes dans l'altération minérale. Jusqu'à très récemment, les champignons mycorhiziens étaient considérés comme les acteurs microbiens majeurs de l'altération minérale en forêt, notamment du fait de leur aptitude à coloniser de grandes surfaces (Paris *et al.*, 1996 ; Jongmans, 1997 ; Fomina *et al.*, 2010). Les résultats de ma thèse montrent non seulement que les champignons n'ont pas le monopole de cette fonction et que, d'autre part, des communautés bactériennes capables d'altérer existent dans d'autres environnements que la rhizosphère ou la mycorhizosphère. Les minéraux doivent donc être considérés comme une niche qui, dans les écosystèmes forestiers, peut influencer la nutrition des arbres au même titre que la rhizosphère et la mycorhizosphère (Figure 5.3). Jusqu'à maintenant en effet, les scientifiques s'attachaient à déterminer le potentiel d'altération des communautés microbiennes de la rhizosphère et de la mycorhizosphère, considérant ainsi la racine comme l'habitat et les minéraux uniquement comme un substrat. Cependant, en considérant les résultats obtenus dans cette thèse ne peut-on pas prendre le problème à l'envers et considérer le minéral comme un habitat et la racine comme une source de nutriments (plutôt organique cette fois) ? Si une communauté microbienne s'établit à la surface des minéraux du sol, on peut se demander quelle est la contribution relative de ces communautés de la minéralosphère dans le flux des éléments nutritifs dans les sols forestiers ?

6. Réflexion sur l'amendement des modèles prédictifs des flux de nutriments :

Le fait que les communautés bactériennes associées à la surface des minéraux puissent être considérées comme des acteurs majeurs de l'altération pose une question sur le mode de calcul du flux d'altération dans les écosystèmes forestiers. La question étant : peut-on intégrer dans les équations complexes des modèles, des informations à différentes échelles et notamment à une échelle microscopique, hétérogène et non maîtrisée ?

A l'heure actuelle, le flux d'altération est calculé en utilisant un modèle géochimique assez connu et utilisé mondialement : le modèle PROFILE (Sverdrup, 1990 ; Sverdrup et Warfvinge, 1995 ; Hodson *et al.*, 1996). Ce modèle détermine le flux d'altération d'un sol en tenant uniquement compte de ses propriétés minéralogiques, physico-chimiques et hydrologiques et de la composition des solutions à l'échelle de l'horizon entier, c'est-à-dire sans tenir compte de l'hétérogénéité du sol et des différences que cela implique pour la composition des solutions. Par exemple, la concentration en agents altérants tels que les acides organiques sera plus forte au niveau de la rhizosphère et de la mycorrhizosphère des arbres que dans le sol environnant (Dakora et Phillips, 2002 ; Dennis *et al.*, 2010), influençant ainsi le taux de dissolution des minéraux en contact avec cette solution. Le facteur biologique est ainsi considéré comme nul et peu important.

Par ailleurs, un autre modèle, utilisé pour prédire la durabilité d'un écosystème forestier, le modèle FORSAFE, tient compte du facteur arbre, mais uniquement dans l'estimation du stockage de la biomasse et de la décomposition de la matière organique (Wallman *et al.*, 2005). Bien que l'auteur du modèle PROFILE ait récemment admis que l'arbre pouvait être responsable d'une partie de l'altération, il n'en reste pas moins convaincu que « le facteur microbiologique est quasi nul et n'intervient pas dans le flux d'altération » (Sverdrup, 2009). Des études ont en effet estimé que, dans le sol d'un écosystème forestier, les racines des arbres n'étaient en contact qu'avec 0,2 à 0,5% des surfaces minérales disponibles (van Breemen *et al.*, 2000). De même, *via* les solutions du sol, le réseau mycélien développé par les champignons symbiotiques à partir des mycorhizes ne seraient en contact qu'avec 15 à 35% des surfaces minérales contenues dans un sol forestier (Sverdrup *et al.*, 2002). Dans le cadre de ma thèse, je démontre qu'il existe une corrélation positive et significative entre l'abondance de groupes taxonomiques bactériens spécifiques, et connus pour leur capacité d'altération, à la surface des minéraux et le taux d'altération globale de ces minéraux, suggérant que ces bactéries seraient potentiellement responsables d'une partie de l'altération des minéraux. Ce résultat laisse donc à penser que tous les minéraux des sols forestiers seraient potentiellement colonisés par des communautés bactériennes capables de les altérer ou participant à ce processus, ce qui suggérerait une contribution du facteur microbiologique dans le flux d'altération minérale. D'autre part, il est à noter qu'à l'heure actuelle, le modèle PROFILE n'estime qu'environ 95% du flux d'altération par rapport à ce qui est réellement observé (Sverdrup, 2009). Ceci implique une sous estimation d'environ 5% de ce flux total d'altération qui est pourtant un facteur déterminant pour la durabilité et la gestion des écosystèmes forestiers. Afin de prédire plus justement le fonctionnement des écosystèmes forestiers et améliorer leur gestion, il serait donc judicieux d'inclure les acteurs biologiques et, plus particulièrement microbiologiques, aux différents modèles de calcul du flux d'altération. Il reste à savoir comment estimer l'impact de ces facteurs.

7. Sols forestiers : réservoir de diversité

Les analyses de la diversité bactérienne des sols ont démontré que les sols forestiers étaient parmi les environnements les plus riches (Fierer et Jackson, 2006 ; Roesch *et al.*, 2007). Les études de diversité réalisées à l'heure actuelle avec les dernières technologies de séquençage, n'arrivent toujours pas à donner une estimation précise de la totalité de la diversité bactérienne présente dans ces sols (Fierer et Jackson, 2006 ; Acosta-Martinez *et al.*, 2010 ; Uroz *et al.*, 2010). Cependant cette grande diversité est peut-être la clef de la durabilité des écosystèmes forestiers. Plus la diversité dans un environnement donné est forte, plus les fonctions potentielles suivant les conditions du milieu sont nombreuses (Altieri, 1999 ; Van der Putten *et al.*, 2004), autrement dit plus la redondance fonctionnelle est importante. Le sol des écosystèmes forestiers est en effet un milieu très hétérogène avec beaucoup de niches écologiques potentielles (rhizosphère et mycorrhizosphère de feuillus, de résineux, minéraux etc.). A titre d'exemple, une étude a suggéré que la diversité des communautés bactériennes de la rhizosphère était limitée par la diversité bactérienne contenue dans le sol environnant (De Ridder-Duine *et al.*, 2005). Etant donné que les communautés microbiennes de la rhizosphère sont « sélectionnées » en fonction des composés organiques et inorganiques exsudés par les arbres, ces derniers pourraient donc structurer les communautés bactériennes associées à leurs racines en fonction de leurs besoins nutritifs. L'étude de Collignon *et al.* (2011) démontrant l'effet des saisons sur la structuration fonctionnelle et métabolique de ces communautés va dans le sens de cette hypothèse.

Dans un moindre degré, cette « sélection » est aussi vraie pour les minéraux du sol. Les communautés bactériennes retrouvées à la surface de ces minéraux sont, elles aussi, limitées par la diversité bactérienne du sol environnant (réservoir). D'ailleurs, dans le chapitre 2 de ma thèse, la comparaison par pyroséquençage des communautés présentes à la surface de l'apatite et dans le sol environnant montre bien cette « sélection ». Les minéraux, essentiellement de part leur minéralogie (contenu nutritif), vont attirer, et donc « sélectionner », des communautés bactériennes particulières qui vont potentiellement être capables de les altérer (pour la plupart). Tout ceci laisse à penser que les communautés microbiennes des écosystèmes forestiers, de part leur grande diversité, seraient potentiellement capables de s'adapter à des conditions environnementales et/ou nutritionnelles variées contribuant ainsi à la durabilité des écosystèmes forestiers.

8. Perspectives

A la vue des résultats obtenus dans cette étude concernant la structuration taxonomique et fonctionnelle des communautés bactériennes de la minéralosphère et leur implication dans le processus de l'altération, de nombreuses hypothèses écologiques peuvent être émises. Cependant, afin de les valider, des travaux intégrant différentes échelles (de la souche modèle à l'environnement) devront être poursuivis avec le souci d'allier écologie microbienne et biogéochimie.

8.1. A court et moyen terme

Dans un premier temps, il est indispensable de faire d'autres expérimentations avec différents minéraux tests enterrés sous des essences d'arbres différentes et ce, à plus grande échelle afin d'avoir des répétitions biologiques pour pouvoir confirmer l'effet essence de l'arbre observé dans le chapitre 2 de ma thèse. Cette étude pourrait s'accompagner de l'identification des exsudats racinaires libérés par les arbres afin de voir si ces derniers ont une influence sur la structuration taxonomique et fonctionnelle sur les communautés bactériennes associées à la surface des minéraux. Des travaux permettant une visualisation *in situ* de la structure de ces communautés directement à la surface des minéraux sans approche destructive permettrait de confirmer ces résultats. L'utilisation de méthodes telle que l'hybridation *in situ* (FISH) est une option.

Par la suite, il serait judicieux de tester l'influence de la disponibilité en nutriments sur les communautés bactériennes associées à la surface des minéraux. Pour tester cet impact, des minéraux pourraient être enterrés sur différents sites expérimentaux en fonction de leur fertilité. En parallèle, des expériences en micro- ou mesocosmes pourraient également être réalisées en mettant des consortia de bactéries provenant de la surface de minéraux, récupérés par une approche cultivable par exemple, en présence d'autres minéraux tests et ce, dans des conditions carencées ou non. Ceci permettrait de voir (i) si les bactéries vont coloniser plus ou moins le minéral selon la disponibilité en nutriments et (ii) d'évaluer leur potentiel d'altération dans les conditions carencées et non carencées.

Une autre expérience serait d'essayer de voir ce que deviennent les nutriments libérés à partir des minéraux. A l'heure actuelle, on ne sait toujours pas si ces nutriments sont utilisés par la bactérie ou s'ils sont juste libérés dans le milieu pour la nutrition de la plante ou les deux. La création de minéraux de synthèse par exemple avec des isotopes stables tel que le ^{26}Mg , le ^{40}Ca ou encore du ^{30}Si , pourrait être un moyen d'évaluer si ces nutriments sont utilisés par la bactérie ou par la plante ou par les deux.

Le développement d'autres biotests en microplaque en utilisant un autre minéral que la biotite tels que de l'apatite, du grenat ou de l'obsidienne, est en cours. Ces tests permettront de comparer le degré d'altération engendré par les bactéries d'un minéral à un autre.

Au vu des résultats concernant la contribution biologique dans le processus de l'altération (arbres et microorganismes), les modèles utilisés actuellement pour calculer le flux d'altération des écosystèmes forestiers paraissent trop approximatifs. Cela implique la mise au point de modèles de calcul plus performants, et donc plus complexes en intégrant l'hétérogénéité des sols, les arbres et les microorganismes du sol. Ces modèles pourraient donc inclure des facteurs comme l'essence d'arbre et les microorganismes associés à la rhizosphère, la mycorrhizosphère et/ou la minéralosphère. Leur contribution pourrait, au préalable être évaluée en conditions *in vitro* afin d'en dégager un coefficient relatif à leur potentiel d'altération pour essayer de l'inclure dans les modèles de calcul.

8.2. A long terme

Dans le cadre de la fertilité des écosystèmes forestiers, des minéraux stérilisés d'une part et préalablement colonisés par des *β-proteobacteria*, ou par un consortium de bactéries provenant de la surface d'un minéral, d'autre part, pourraient être enterrés sur un site pauvre en nutriment. Ceci permettrait de juger de l'effet « fertilisation » de minéraux assez facilement altérables tels que de l'apatite ou de la biotite. En parallèle, une expérience avec de la dolomie en poudre (chaulage) pourrait être réalisée afin de comparer l'effet fertilisant du chaulage avec celui des minéraux enterrés. Le mieux serait de faire ces expériences à court, moyen et long terme afin de juger de l'épuisement (ou non) des sols dans les deux cas. Il faudrait aussi penser à avoir une condition où l'on rajoute uniquement des bactéries à fort potentiel altérant tels que *Burkholderia* et *Collimonas*. Bien sûr des études seraient préalablement réalisées en laboratoire en microcosmes avant de faire une expérimentation sur le terrain, ne serait-ce que pour juger du maintien des bactéries à la surface des minéraux. Ces expériences pourraient donner lieu à la création de fertilisants spécialement conçus pour les écosystèmes forestiers pauvres en nutriments. Le bois étant une des ressources du futur, cette application pourrait être un atout majeur pour une meilleure gestion des écosystèmes forestiers. Dans ce cadre, des parallèles pourraient être faits avec des études d'écophysiologie des écosystèmes forestiers.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aarnio, T., Rätty, M. and Martikainen, P. J.** (2003). Long-term availability of nutrients in forest soil derived from fast-and slow-release fertilizers. *Plant and soil* **252**, 227–239.
- Acosta-Martínez, V., Dowd, S. E., Sun, Y., Wester, D. and Allen, V.** (2010). Pyrosequencing analysis for characterization of soil bacterial populations as affected by an integrated livestock-cotton production system. *Applied Soil Ecology* **45**, 13–25.
- Adamo, P. and Violante, P.** (2000). Weathering of rocks and neogenesis of minerals associated with lichen activity. *Applied Clay Science* **16**, 229–256.
- Adamson, C., McCabe, S., Warke, P. A., McAllister, D. and Smith, B. J.** (2012). The influence of aspect on the biological colonization of stone in Northern Ireland. *International Biodeterioration & Biodegradation*. In press.
- Alexander, D. B. and Zuberer, D. A.** (1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils* **12**, 39–45.
- Altieri, M. A.** (1999). The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **74**, 19–31.
- Ams, D. A., Maurice, P. A., Hersman, L. E. and Forsythe, J. H.** (2002). Siderophore production by an aerobic *Pseudomonas mendocina* bacterium in the presence of kaolinite. *Chemical Geology* **188**, 161–170.
- Anderson, T.-H.** (1998). The influence of acid irrigation and liming on the soil microbial biomass in a Norway spruce (*Picea abies* [L.] K.) stand. *Plant and Soil* **199**, 117–122.
- Angeli, M., Hébert, R., Menéndez, B., David, C. and Bigas, J.-P.** (2010). Influence of temperature and salt concentration on the salt weathering of a sedimentary stone with sodium sulphate. *Engineering Geology* **115**, 193–199.
- Antoun, H., Beauchamp, C. J., Goussard, N., Chabot, R. and Lalande, R.** (1998). Potential of Rhizobium and Bradyrhizobium species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and soil* **204**, 57–67.
- Arocena, J. and Glowa, K.** (2000a). Mineral weathering in ectomycorrhizosphere of subalpine fir (*Abies lasiocarpa* (Hook.) Nutt.) as revealed by soil solution composition. *Forest Ecology and Management* **133**, 61–70.
- Arocena, J. and Glowa, K.** (2000b). Mineral weathering in ectomycorrhizosphere of subalpine fir (*Abies lasiocarpa* (Hook.) Nutt.) as revealed by soil solution composition. *Forest Ecology and Management* **133**, 61–70.
- Ascasoa, C., Wierzchosb, J. and Castelloa, R.** (1998). Study of the biogenic weathering of calcareous litharenite stones caused by lichen and endolithic microorganisms. *International Biodeterioration & Biodegradation* **42**, 29–38.
- Atlas, R. M.** (1994). Handbook of Microbiological Media. L.C. Parks. CRC Press.
- Aubouin, J., Brousse, R. and Lehman, J. P.** (1975). *Précis de géologie 1. Petrologie* 1975, bordas, Paris.
- Augusto, L., Turpault, M.-P. and Ranger, J.** (2000). Impact of forest tree species on feldspar weathering rates. *Geoderma* **96**, 215–237.
- Ayres, E., Steltzer, H., Berg, S., Wallenstein, M. D., Simmons, B. L. and Wall, D. H.** (2009). Tree Species Traits Influence Soil Physical, Chemical, and Biological Properties in High Elevation Forests. *PLoS ONE* **4**, 59-64.
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., et al.** (2008). The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* **9**, 75-90.
- Babu-Khan, S., Yeo, T. C., Martin, W. L., Duron, M. R., Rogers, R. D. and Goldstein, A. H.** (1995). Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 972–978.
- Bäckman, J. S. K., Hermansson, A., Tebbe, C. C. and Lindgren, P.-E.** (2003). Liming induces growth of a diverse flora of ammonia-oxidising bacteria in acid spruce forest soil as determined by SSCP and DGGE. *Soil Biology and Biochemistry* **35**, 1337–1347.
- Badeau, V., Dambrine, E. and Walter, C.** (1999). Propriétés des sols forestiers français: résultats du premier inventaire systématique. *Etude et Gestion des Sols*, **6**, 165-180.
- Badri, D. V., Quintana, N., El Kassis, E. G., Kim, H. K., Choi, Y. H., Sugiyama, A., Verpoorte, R., Martinoia, E., Manter, D. K. and Vivanco, J. M.** (2009). An ABC Transporter Mutation Alters Root Exudation of Phytochemicals That Provoke an Overhaul of Natural Soil Microbiota. *Plant Physiology* **151**, 2006–2017.
- Bahr, H.-A., Fischer, G. and Weiss, H.-J.** (1986). Thermal-shock crack patterns explained by single and multiple crack propagation. *Journal of Materials Science* **21**, 2716–2720.
- Bakken, A. K., Gautneb, H., Sveistrup, T. and Myhr, K.** (2000). Crushed rocks and mine tailings applied as K fertilizers on grassland. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **56**, 53–57.

- Balland, C., Poszwa, A., Leyval, C. and Mustin, C.** (2010). Dissolution rates of phyllosilicates as a function of bacterial metabolic diversity. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **74**, 5478–5493.
- Balogh-Brunstad, Z., Kent Keller, C., Thomas Dickinson, J., Stevens, F., Li, C. Y. and Bormann, B. T.** (2008). Biotite weathering and nutrient uptake by ectomycorrhizal fungus, *Suillus tomentosus*, in liquid-culture experiments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **72**, 2601–2618.
- Banfield, J. F., Barker, W. W., Welch, S. A. and Taunton, A.** (1999). Biological impact on mineral dissolution: Application of the lichen model to understanding mineral weathering in the rhizosphere. *PNAS* **96**, 3404–3411.
- Banfield, J. F. and Hamers, R. J.** (1997). Processes at minerals and surfaces with relevance to microorganisms and prebiotic synthesis. In *Geomicrobiology: Interactions between Microbes and Minerals*, pp. 391-428, Mineralogical Soc America, Washington.
- Barker, W. W. and Banfield, J. F.** (1996). Biologically versus inorganically mediated weathering reactions : relationships between minerals and extracellular microbial polymers in lithobiontic communities. *Chemical Geology* **132**, 55-69.
- Barker, W. W., Welch, S. A. and Banfield, J. F.** (1997). Biogeochemical weathering of silicate minerals. In *Geomicrobiology: Interactions between Microbes and Minerals*, Banfield, J.F and Nealson, K.H. (eds), pp. 391-428. Mineralogical Soc America, Washington.
- Barker, W.W. , Welch, S.A., Chu, S. and Banfield, J.F.** (1998). Experimental observations of the effects of bacteria on aluminosilicate weathering. *American Mineralogist* **83**, 1551–1563.
- Barral Silva, M. T., Silva Hermo, B., García-Rodeja, E. and Vázquez Freire, N.** (2005). Reutilization of granite powder as an amendment and fertilizer for acid soils. *Chemosphere* **61**, 993–1002.
- Barton, H.A., Taylor, N.M., Kreate, M.P., Springer, A.C., Oehrle, S.A. and Bertog, J.L.** (2007). The impact of host rock geochemistry on bacterial community structure in oligotrophic cave environments. *International Journal of Speleology* **36**, 93-104.
- Beckett, C. S., Loughman, J. A., Karberg, K. A., Donato, G. M., Goldman, W. E. and Kranz, R. G.** (2002). Four genes are required for the system II cytochrome c biogenesis pathway in *Bordetella pertussis*, a unique bacterial model. *Molecular microbiology* **38**, 465–481.
- Belkacem, S., Nys, C. and Gelhaye, D.** (1992). Effets d'une fertilisation et d'un amendement sur l'immobilisation d'éléments dans la biomasse d'un peuplement adulte d'épicéa commun (*Picea abies* L Karst). *Annales des Sciences Forestières* **49**, 235–252.
- Bennett, P. C., Siegel, D. I., Hill B. M. and Glaser, P. H.** (1991). Fate of silicate minerals in a peat bog. *Geology* **19**, 328-331.
- Bennett, P. C., Hiebert, F. K. and Choi, W. J.** (1996). Microbial colonization and weathering of silicates in a petroleum-contaminated groundwater. *Chemical Geology* **132**, 45–53.
- Bennett, P. C., Rogers, J. R., Choi, W. J. and Hiebert, F. K.** (2001). Silicates, Silicate Weathering, and Microbial Ecology *Geomicrobiology Journal*, **18**, 3–19.
- Berry, D., Mahfoudh, K. B., Wagner, M. and Loy, A.** (2011). Barcoded primers used in multiplex amplicon pyrosequencing bias amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, In press.
- Berthelin, J.** (1983). Microbial weathering processes. In *Microbial geochemistry*, Ed W E Krumbein, pp. 223-262. Blackwell Scientific Publications, Oxford UK.
- Berthelin, J., Leyval, C. and Toutain, T.** (1983). Biologie des sols : Rôle des organismes dans l'altération et l'humification, In *Pédologie. 2. Constituants et propriétés du sol*, pp 143-238, Masson, Paris.
- Berthelin, J.** (1985). Microbial weathering processes in natural environments. In *Physical and chemical weathering in geochemical cycles*, Eds A Lerman and M Meybeck. 3360. Kluwer, Dordrecht, Boston, London
- Bini, E.** (2010). Archaeal transformation of metals in the environment. *FEMS Microbiology Ecology* **73**, 1–16.
- Blake, R. E. and Walter, L. M.** (1996). Effects of organic acids on the dissolution of orthoclase at 80°C and pH 6. *Chemical Geology* **132**, 91–102.
- Blake II, R. C., Shute, E. A. and Howard, G. T.** (1994). Solubilization of Minerals by Bacteria: Electrophoretic Mobility of *Thiobacillus ferrooxidans* in the Presence of Iron, Pyrite, and Sulfur. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 3349–3357.
- Blum, J. D., Klaue, A., Nezat, C. A., Driscoll, C. T., Johnson, C. E., Siccama, T. G., Eagar, C., Fahey, T. J. and Likens, G. E.** (2002). Mycorrhizal weathering of apatite as an important calcium source in base-poor forest ecosystems. *Nature* **417**, 729–731.

- Bolan, N. S., Naidu, R., Mahimairaja, S. and Baskaran, S.** (1994). Influence of low-molecular-weight organic acids on the solubilization of phosphates. *Biology and Fertility of Soils* **18**, 311–319.
- Bonneau, M., Gelpe, J. and Le Tacon, F.** (1968). Influence des conditions de nutrition minérale sur le dépérissement du Pin maritime dans les Landes de Gascogne. *Annales des Sciences Forestières* **25**, 251–289.
- Bonneau, M.** (2007). Le dépérissement des forêts des années 80 : Roche mère, pluies acides et climat. In « Forêt et pollution », Ed. Andrée Corvol., GHFF, Paris.
- Bonneville, S., Smits, M. M., Brown, A., Harrington, J., Leake, J. R., Brydson, R. and Benning, L. G.** (2009). Plant-driven fungal weathering: Early stages of mineral alteration at the nanometer scale. *Geology* **37**, 615–618.
- Borin, S., Ventura, S., Tambone, F., Mapelli, F., Schubotz, F., Brusetti, L., Scaglia, B., D'Acqui, L. P., Solheim, B., Turicchia, S., et al.** (2009). Rock weathering creates oases of life in a High Arctic desert. *Environmental Microbiology* **12**, 293–303.
- Bormann F.H. and Linkens G.E.**, 1979. Pattern and process in a forested ecosystem, Berlin.
- Bourne, H. R., Coffino, P. and Tomkins, G. M.** (1975). Somatic genetic analysis of cyclic AMP action: characterization of unresponsive mutants. *Journal of Cellular physiology* **85**, 611–620.
- Bouwman, C. W., Kohli, M., Killoran, A., Touchie, G. A., Kadner, R. J. and Martin, N. L.** (2003). Characterization of SrgA, a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence plasmid-encoded paralogue of the disulfide oxidoreductase DsbA, essential for biogenesis of plasmid-encoded fimbriae. *Journal of Bacteriology* **185**, 991–1000.
- Boyd, E. S., Cummings, D. E. and Geesey, G. G.** (2007). Mineralogy influences structure and diversity of bacterial communities associated with geological substrata in a pristine aquifer. *Microbial ecology* **54**, 170–182.
- Brantley, S. L., Liermann, L. and Bullen, T. D.** (2001). Fractionation of Fe isotopes by soil microbes and organic acids. *Geology* **29**, 535–538.
- Brantley, S. L., Liermann, L., Bau, M. and Wu, S.** (2001). Uptake of Trace Metals and Rare Earth Elements from Hornblende by a Soil Bacterium. *Geomicrobiology Journal* **18**, 37–61.
- Brantley, S.L.** (2003). Reaction kinetics of primary rock-forming minerals under ambient Conditions. In: *Fresh Water Geochemistry, Weathering, and Soils*, J.I. Drever (ed.), v. 5 of Treatise on Geochemistry, K.K. Turekian and H.D. Holland (ed.), pp. 73-118, Pergamon Press, Oxford.
- Brantley, S. L., Liermann, L. J., Guynn, R. L., Anbar, A., Icopini, G. A. and Barling, J.** (2004). Fe isotopic fractionation during mineral dissolution with and without bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **68**, 3189–3204.
- Brantley, S.L., Y. Chen.** (1995). Chemical weathering rates of pyroxenes and amphiboles. In: *Chemical Weathering Rates of Silicate Minerals*, A.F. White and S.L. Brantley (eds.), pp. 119-172, Mineralogical Society of America Short Course **31**.
- Brantley, S.L. (2008).** Kinetics of Mineral Dissolution, In *Kinetics of Water-Rock Interaction* S.L. Brantley, J.D. Kubicki, & A.F. White (eds.), pp. 151-210, Springer, NewYork, Chapter 5.
- Bryan, R. B.** (2000). Soil erodibility and processes of water erosion on hillslope. *Geomorphology* **32**, 385–415.
- Buch, A., Archana, G. and Naresh Kumar, G.** (2008). Metabolic channeling of glucose towards gluconate in phosphate-solubilizing *Pseudomonas aeruginosa* P4 under phosphorus deficiency. *Research in Microbiology* **159**, 635–642.
- Burford, E. P., Kierans, M. and Gadd, G. M.** (2003). Geomycology: fungi in mineral substrata. *Mycologist* **17**, 98–107.
- Burke, M. K. and Raynal, D. J.** (1998). Liming influences growth and nutrient balances in sugar maple (*Acer saccharum*) seedlings on an acidic forest soil. *Environmental and Experimental Botany* **39**, 105–116.
- Busalmen, J. P. and de Sánchez, S. R.** (2005). Electrochemical Polarization-Induced Changes in the Growth of Individual Cells and Biofilms of *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17552). *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 6235–6240.
- Caballero-Mellado, J., Onofre-Lemus, J., Santos, P. E. los and Martínez-Aguilar, L.** (2007). The Tomato Rhizosphere, an Environment Rich in Nitrogen-Fixing Burkholderia Species with Capabilities of Interest for Agriculture and Bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 5308–5319.
- Calvaruso, C., Turpault, M.-P. and Frey-Klett, P.** (2006). Root-Associated Bacteria Contribute to Mineral Weathering and to Mineral Nutrition in Trees: a Budgeting Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 1258–1266.
- Calvaruso, C., Turpault, M.-P., Leclerc, E. and Frey-Klett, P.** (2007). Impact of Ectomycorrhizosphere on the Functional Diversity of Soil Bacterial and Fungal Communities from a Forest Stand in Relation to Nutrient Mobilization Processes. *Microbial Ecology* **54**, 567–577.

- Calvaruso, C., Turpault, M.-P., Leclerc, E., Ranger, J., Garbaye, J., Uroz, S. and Frey-Klett, P.** (2010). Influence of Forest Trees on the Distribution of Mineral Weathering-Associated Bacterial Communities of the *Sclerotinia citrinum* Mycorrhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 4780–4787.
- Calvaruso, C., N'Dira, V. and Turpault, M.-P.** (2011). Impact of common European tree species and Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* [Mirb.] Franco) on the physicochemical properties of the rhizosphere. *Plant and Soil* **342**, 469–480.
- Carnol, M., Kowalchuk, G. A. and De Boer, W.** (2002). Nitrosomonas europaea-like bacteria detected as the dominant β -subclass Proteobacteria ammonia oxidisers in reference and limed acid forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* **34**, 1047–1050.
- Carpenter, D., Hodson, M. E., Eggleton, P. and Kirk, C.** (2007). Earthworm induced mineral weathering: Preliminary results. *European Journal of Soil Biology* **43**, S176–S183.
- Carson, J. K., Rooney, D., Gleeson, D. B. and Clipson, N.** (2007). Altering the mineral composition of soil causes a shift in microbial community structure. *FEMS Microbiology Ecology* **61**, 414–423.
- Carson, J. K., Campbell, L., Rooney, D., Clipson, N. and Gleeson, D. B.** (2009). Minerals in soil select distinct bacterial communities in their microhabitats. *FEMS Microbiology Ecology* **67**, 381–388.
- Carson, J. K., Gonzalez-Quinones, V., Murphy, D. V., Hinz, C., Shaw, J. A. and Gleeson, D. B.** (2010). Low Pore Connectivity Increases Bacterial Diversity in Soil. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 3936–3942.
- Certini, G., Campbell, C. D. and Edwards, A. C.** (2004). Rock fragments in soil support a different microbial community from the fine earth. *Soil Biology and Biochemistry* **36**, 1119–1128.
- Chabot, R., Antoun, H. and Cescas, M. P.** (1996). Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar. phaseoli. *Plant and soil* **184**, 311–321.
- Chagnon, M., Paré, D., Hébert, C. and Camiré, C.** (2001). Effects of experimental liming on collembolan communities and soil microbial biomass in a southern Quebec sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) stand. *Applied Soil Ecology* **17**, 81–90.
- Chanal, A., Chapon, V., Benzerara, K., Barakat, M., Christen, R., Achouak, W., Barras, F. and Heulin, T.** (2006). The desert of Tataouine: an extreme environment that hosts a wide diversity of microorganisms and radiotolerant bacteria. *Environmental Microbiology* **8**, 514–525.
- Chen, J., Blume, H.-P. and Beyer, L.** (2000). Weathering of rocks induced by lichen colonization — a review. *Catena* **39**, 121–146.
- Chenu, C. and Roberson, E. B.** (1996). Diffusion of glucose in microbial extracellular polysaccharide as affected by water potential. *Soil Biology and Biochemistry* **28**, 877–884.
- Chimiak, A., Hider, R., Liu, A., Neilands, J., Nomoto, K., Sugiura, Y. and Neilands, J.** (1984a). Methodology of siderophores. In *Siderophores from Microorganisms and Plants*, pp. 1–24. Springer Berlin / Heidelberg.
- Choi, O., Kim, J., Kim, J.-G., Jeong, Y., Moon, J. S., Park, C. S. and Hwang, I.** (2007). Pyrroloquinoline Quinone Is a Plant Growth Promotion Factor Produced by *Pseudomonas fluorescens* B16. *Plant Physiology* **146**, 657–668.
- Chow, M. L., Radomski, C. C., McDermott, J., Davies, J. and Axelrod P.** (2002). Molecular characterization of bacterial diversity in Lodgepole pine (*Pinus contorta*) rhizosphere soils from British Columbia forest soils differing in disturbance and geographic source. *FEMS Microbiology Ecology* **42**, 347–357.
- Ciferri, O.** (1999). Microbial Degradation of Paintings. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 879–885.
- Clark, A. G.** (1969). A Selective Medium for the Isolation of *Agrobacterium* Species. *Journal of Applied Microbiology* **32**, 348–351.
- Cleton-Jansen, A. M., Goosen, N., Wenzel, T. J. and van de Putte, P.** (1988). Cloning of the gene encoding quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*: evidence for the presence of a second enzyme. *Journal of Bacteriology* **170**, 2121–2125.
- Cleton-Jansen, A.-M., Goosen, N., Vink, K. and van de Putte, P.** (1989). Cloning, characterization and DNA sequencing of the gene encoding the M₅₀₀₀₀ quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*; *Molecular and General Genetics* **217**, 430–436.
- Cleton-Jansen, A. M., Goosen, N., Fayet, O. and Putte, P. van de** (1990). Cloning, mapping, and sequencing of the gene encoding *Escherichia coli* quinoprotein glucose dehydrogenase. *Journal of Bacteriology* **172**, 6308–6315.
- Cleton-Jansen, A. M., Dekker, S., van de Putte, P. and Goosen, N.** (1991). A single amino acid substitution changes the substrate specificity of quinoprotein glucose dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans*. *Molecular and General Genetics* **229**, 206–212.

- Clivot, H., Pagnout, C., Aran, D., Devin, S., Bauda, P., Poupin, P. and Guérol, F. (2012). Changes in soil bacterial communities following liming of acidified forests. *Applied Soil Ecology* **59**, 116–123.
- Cockell, C. S. and Stokes, M. D. (2004). Ecology: Widespread colonization by polar hypoliths. *Nature* **431**, 414–414.
- Cockell, C. S., McKay, C. P., Warren-Rhodes, K. and Horneck, G. (2008). Ultraviolet radiation-induced limitation to epilithic microbial growth in arid deserts – Dosimetric experiments in the hyperarid core of the Atacama Desert. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **90**, 79–87.
- Cockell, C., Olsson, K., Knowles, F., Kelly, L., Herrera, A., Thorsteinnsson, T. and Marteinnsson V. (2009). Bacteria in weathered basaltic glass, Iceland. *Geomicrobiology Journal* **29**, 491–507.
- Cockell, C. S., Pybus, D., Olsson-Francis, K., Kelly, L., Petley, D., Rosser, N., Howard, K. and Mosselmans, F. (2010a). Molecular Characterization and Geological Microenvironment of a Microbial Community Inhabiting Weathered Receding Shale Cliffs. *Microbial Ecology* **61**, 166–181.
- Cockell, C. S., Osinski, G. R., Banerjee, N. R., Howard, K. T., Gilmour, I. and Watson, J. S. (2010b). The microbe-mineral environment and gypsum neogenesis in a weathered polar evaporite. *Geobiology* **8**, 293–308.
- Cockell, C. S., van Calsteren, P., Mosselmans, J. F. W., Franchi, I. A., Gilmour, I., Kelly, L., Olsson-Francis, K. and Johnson, D. (2010c). Microbial endolithic colonization and the geochemical environment in young seafloor basalts. *Chemical Geology* **279**, 17–30.
- Coenye, T., Laevens, S., Willems, A., Ohlén, M., Hannant, W., Govan, J. R., Gillis, M., Falsen, E. and Vandamme, P. (2001). *Burkholderia fungorum* sp. nov. and *Burkholderia caledonica* sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**, 1099–1107.
- Colin-belgrand, M., Dambrine, E., Bienaimé, S., Nys, C. and Turpault, M. (2003). Influence of Tree Roots on Nitrogen Mineralization. *Scandinavian Journal of Forest Research* **18**, 260–268.
- Collet, J.-F., Riemer, J., Bader, M. W. and Bardwell, J. C. A. (2002). Reconstitution of a disulfide isomerization system. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 26886–26892.
- Collignon, C., Uroz, S., Turpault, M.-P. and Frey-Klett, P. (2011). Seasons differently impact the structure of mineral weathering bacterial communities in beech and spruce stands. *Soil Biology and Biochemistry* **43**, 2012–2022.
- Compant, S., Nowak, J., Coenye, T., Clément, C. and Ait Barka, E. (2008). Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS Microbiology Reviews* **32**, 607–626.
- Coroneos, C., Hinsinger, P. and Gilkes, R. J. (1996). Granite powder as a source of potassium for plants: a glasshouse bioassay comparing two pasture species. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **45**, 143–152.
- Courty, P.-E., Buée, M., Diedhiou, A. G., Frey-Klett, P., Le Tacon, F., Rineau, F., Turpault, M.-P., Uroz, S. and Garbaye, J. (2010). The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts. *Soil Biology and Biochemistry* **42**, 679–698.
- Crespo, J. M. (2011). Mineral phosphate solubilization activity of *gluconacetobacter diazotrophicus* under P-limitation and plant root environment. *Agricultural Sciences* **02**, 16–22.
- Crooke, H. and Cole, J. (1995). The biogenesis of c-type cytochromes in *Escherichia coli* requires a membrane-bound protein, DipZ, with a protein disulphide isomerase-like domain. *Molecular Microbiology* **15**, 1139–1150.
- Dakora, F.D. and Phillips, D. A. (2002). Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil* **245**, 35–47.
- Danin, A., Gerson, R., Marton, K. and Garty, J. (1982). Patterns of limestone and dolomite weathering by lichens and blue-green algae and their palaeoclimatic significance. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **37**, 221–233.
- Davis, K. J. and Lüttge, A. (2005). Quantifying the relationship between microbial attachment and mineral surface dynamics using vertical scanning interferometry (VSI). *American Journal of Science* **305**, 727–751.
- Davis, K. J., Nealson, K. H. and Lüttge, A. (2007). Calcite and dolomite dissolution rates in the context of microbe-mineral surface interactions. *Geobiology* **5**, 191–205.
- De Boer, W. (2004a). *Collimonas fungivorans* gen. nov., sp. nov., a chitinolytic soil bacterium with the ability to grow on living fungal hyphae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**, 857–864.
- De Boer, W. (2004b). *Collimonas fungivorans* gen. nov., sp. nov., a chitinolytic soil bacterium with the ability to grow on living fungal hyphae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**, 857–864.

- De Boer, W., Klein Gunnewiek, P. J. A. and Woldendorp, J. W.** (1998a). Suppression of hyphal growth of soil-borne fungi by dune soils from vigorous and declining stands of *Ammophila arenaria*. *New Phytologist* **138**, 107–116.
- De Boer, W., Klein Gunnewiek, P. J. A., Lafeber, P., Janse, J. D., Spit, B. E. and Woldendorp, J. W.** (1998b). Anti-fungal properties of chitinolytic dune soil bacteria. *Soil Biology and Biochemistry* **30**, 193–203.
- De Boer, W., Gerards, S., Klein Gunnewiek, P. J. A. and Modderman, R.** (1999). Response of the chitinolytic microbial community to chitin amendments of dune soils. *Biology and Fertility of Soils* **29**, 170–177.
- De Los Santos-Villalobos, S., Barrera-Galicia, G. C., Miranda-Salcedo, M. A. and Peña-Cabriales, J. J.** (2012). Burkholderia cepacia XXVI siderophore with biocontrol capacity against Colletotrichum gloeosporioides. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **28**, 2615–2623.
- Denef, J., Six, J., Merckx, R. and Paustian, K.** (2002). Short-term effects of biological and physical forces on aggregate formation in soils with different clay mineralogy. *Plant and Soil* **246**, 185–200.
- De Ridder-Duine, A. S., Kowalchuk, G. A., Klein Gunnewiek, P. J. A., Smant, W., van Veen, J. A. and de Boer, W.** (2005). Rhizosphere bacterial community composition in natural stands of *Carex arenaria* (sand sedge) is determined by bulk soil community composition. *Soil Biology and Biochemistry* **37**, 349–357.
- De los Rios, A., Wierzchos, J., Sancho, L. G. and Ascaso, C.** (2004). Exploring the physiological state of continental Antarctic endolithic microorganisms by microscopy. *FEMS Microbiology Ecology* **50**, 143–152.
- De los Rios, A., Camara, B., Garcíadelcura, M., Rico, V., Galvan, V. and Ascaso, C.** (2009). Deteriorating effects of lichen and microbial colonization of carbonate building rocks in the Romanesque churches of Segovia (Spain). *Science of The Total Environment* **407**, 1123–1134.
- De los Rios, A., Valea, S., Ascaso, C., Davila, A., Kastovsky, J., McKay, C. P., Gomez-silva, B. and Wierzchos, J.** (2010). Comparative analysis of the microbial communities inhabiting halite evaporites of the Atacama desert. *International Microbiology* **13**, 79–89.
- Delvasto, P., Ballester, A., Muñoz, J. A., González, F., Blázquez, M. L., Igual, J. M., Valverde, A. and García-Balboa, C.** (2009). Mobilization of phosphorus from iron ore by the bacterium *Burkholderia caribensis* FeGL03. *Minerals Engineering* **22**, 1–9.
- Demba Diallo, M., Willems, A., Vloemans, N., Cousin, S., Vandekerckhove, T. T., de Lajudie, P., Neyra, M., Vyverman, W., Gillis, M. and Van der Gucht, K.** (2004). Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the N₂-fixing bacterial diversity in soil under *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* and *Balanites aegyptiaca* in the dryland part of Senegal. *Environmental Microbiology* **6**, 400–415.
- Dennis, P. G., Miller, A. J. and Hirsch, P. R.** (2010). Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbiology Ecology* **72**, 313–327.
- Devasia, P., Natarajan, K. A., Sathyanarayana, D. N. and Rao, G. R.** (1993). Surface Chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* Relevant to Adhesion on Mineral Surfaces. *Appl Environ Microbiol* **59**, 4051–4055.
- Drever, J.I.** (2005). *Surface and Ground Water, Weathering, and Soils*. Elsevier, Amsterdam.
- Drever, J. I. and Stillings, L. L.** (1997). The role of organic acids in mineral weathering. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **120**, 167–181.
- Droege, M. and Hill, B.** (2008). The Genome Sequencer FLX System—longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets. *Journal of Biotechnology* **136**, 3–10.
- Duchaufour, P.** (1983). *Pédologie. 1. Pédogénèse et classification*, Masson, Paris.
- Duine, J. A.** (1991). Quinoproteins: enzymes containing the quinonoid cofactor pyrroloquinoline quinone, topaquinone or tryptophan-tryptophan quinone. *European Journal of Biochemistry* **200**, 271–284.
- Dupouey, J.L., Dambrine, E., Lafitte, J. D. and Moraes, C.J.** (2002). Irreversible impact of past land use on forest soils and biodiversity. *Ecology*, **83**(11), 2978–2984.
- Duvigneaud, P.** (1974) *La synthèse écologique. Populations, communautés, écosystèmes, biosphère, noosphère*. Paris, Doin..
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M. and Böttger, E. C.** (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* **17**, 7843–7853.
- Elhani, S., Guehl, J.-M., Nys, C., Picard, J.-F. and Dupouey, J.-L.** (2005). Impact of fertilization on tree-ring delta¹⁵N and delta¹³C in beech stands: a retrospective analysis. *Tree Physiology* **25**, 1437–1446.

- Engelbrekton, A., Kunin, V., Wrighton, K. C., Zvenigorodsky, N., Chen, F., Ochman, H. and Hugenholtz, P. (2010). Experimental factors affecting PCR-based estimates of microbial species richness and evenness. *The ISME Journal* **4**, 642–647.
- Espiau, P. (1983). Le complexe absorbant, In *Pédologie. 2. Constituants et propriétés du sol*, pp 489-510, Masson, Paris.
- Faramarzi, M. A. and Brandl, H. (2006). Formation of water-soluble metal cyanide complexes from solid minerals by *Pseudomonas plecoglossicida*. *FEMS Microbiology Letters* **259**, 47–52.
- Feissner, R. E., Beckett, C. S., Loughman, J. A. and Kranz, R. G. (2005). Mutations in Cytochrome Assembly and Periplasmic Redox Pathways in *Bordetella pertussis*. *Journal of Bacteriology* **187**, 3941–3949.
- Felder, M., Gupta, A., Verma, V., Kumar, A., Qazi, G. . and Cullum, J. (2000). The pyrroloquinoline quinone synthesis genes of *Gluconobacter oxydans*. *FEMS Microbiology Letters* **193**, 231–236.
- Fichter, J., Turpault, M.-P., Dambrine, E. and Jacques Ranger (1998). Localization of base cations in particle size fractions of acid forest soils (Vosges Mountains, N-E France). *Geoderma* **82**, 295–314.
- Fierer, N. and Jackson, R. B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 626–631.
- Fliege, R., Tong, S., Shibata, A., Nickerson, K. W. and Conway, T. (1992). The Entner-Doudoroff pathway in *Escherichia coli* is induced for oxidative glucose metabolism via pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 3826–3829.
- Fomina, M., Burford, E. P., Hillier, S., Kierans, M. and Gadd, G. M. (2010). Rock-Building Fungi. *Geomicrobiology Journal* **27**, 624–629.
- Foramazi, M. and Brandl, H. (2006). Formation of water-soluble metal cyanide complexes form solid minerals by *Pseudomonas plecoglossicida*. *FEMS Microbiology Letters* **259**, 47-52.
- Fortin, D., Ferris, F. G. et Beveridge, T. J. (1997). Surface-mediated mineral development by bacteria In *Geomicrobiology: Interactions between Microbes and Minerals*, pp.391-428, Mineralogical Soc America, Washington.
- Fredrickson, J. K. and Zachara, J. M. (2008). Electron transfer at the microbe–mineral interface: a grand challenge in biogeochemistry. *Geobiology* **6**, 245–253.
- Frey, P., Frey-Klett, P., Garbaye, J., Berge, O. and Heulin, T. (1997). Metabolic and Genotypic Fingerprinting of Fluorescent *Pseudomonads* Associated with the Douglas Fir-Laccaria bicolor Mycorrhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 1852–1860.
- Frey, B., Rieder, S. R., Brunner, I., Plotze, M., Koetzsch, S., Lapanje, A., Brandl, H. and Furrer, G. (2010). Weathering-Associated Bacteria from the Damma Glacier Forefield: Physiological Capabilities and Impact on Granite Dissolution. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 4788–4796.
- Frey-Klett, P., Chavatte, M., Clause, M.-L., Courier, S., Roux, C. L., Raaijmakers, J., Martinotti, M. G., Pierrat, J.-C. and Garbaye, J. (2004). Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytologist* **165**, 317–328.
- Fritsche, K., De Boer, W., Gerards, S., Van Den Berg, M., Van Veen, J. A. and Leveau, J. H. J. (2008). Identification and characterization of genes underlying chitinolysis in *Collimonas fungivorans* Ter331. *FEMS Microbiology Ecology* **66**, 123–135.
- Furnes, H. (2004). Early Life Recorded in Archean Pillow Lavas. *Science* **304**, 578–581.
- Gadd, G. M. (2007). Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research* **111**, 3–49.
- Gaillardet, J., Dupré, B., Louvat, P. et Allègre C. J. (1999). Global silicate weathering and CO₂ consumption rates deduced from the chemistry of large rivers. *Chemical Geology*, **159**, 3-30.
- Garau, G., Castaldi, P., Santona, L., Deiana, P. and Melis, P. (2007). Influence of red mud, zeolite and lime on heavy metal immobilization, culturable heterotrophic microbial populations and enzyme activities in a contaminated soil. *Geoderma* **142**, 47–57.
- Garcia de Miguel, J. M. G., Sanchez-Castillo, L., Ortega-Calvo, J. J., Gil, J. A. and Saiz-Jimenez, C. (1995). Deterioration of building materials from the Great Jaguar Pyramid at Tikal, Guatemala. *Building and Environment* **30**, 591–598.
- Gaylarde, C. C., Rodríguez, C. H., Navarro-Noya, Y. E. and Ortega-Morales, B. O. (2012). Microbial Biofilms on the Sandstone Monuments of the Angkor Wat Complex, Cambodia. *Current Microbiology* **64**, 85–92.

- Gillet, P., Barrat, J. A., Heulin, T., Achouak, W., Lesourd, M., Guyot, F. and Benzerara, K.** (2000). Bacteria in the Tatahouine meteorite: nanometric-scale life in rocks. *Earth and Planetary Science Letters* **175**, 161–167.
- Gillies, J. A., Nickling, W. G. and Tilson, M.** (2009). Ventifacts and wind-abraded rock features in the Taylor Valley, Antarctica. *Geomorphology* **107**, 149–160.
- Glatzel G.** (1991). The impact of historic land use and modern forestry on nutrient relations of Central European forest ecosystems. *Fertilizer Research* **27**, 1-8.
- Gleeson, D., McDermott, F. and Clipson, N.** (2006). Structural diversity of bacterial communities in a heavy metal mineralized granite outcrop. *Environmental Microbiology* **8**, 383–393.
- Gleiter, S. and Bardwell, J. C. A.** (2008). Disulfide bond isomerization in prokaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1783**, 530–534.
- Godoy, D., Randle, G., Simpson, A. J., Aanensen, D. M., Pitt, T. L., Kinoshita, R. and Spratt, B. G.** (2003). Multilocus Sequence Typing and Evolutionary Relationships among the Causative Agents of Melioidosis and Glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 2068–2079.
- Goldstein, Braverman and Osorio** (1999). Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limited desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) rhizobacterium. *FEMS Microbiology Ecology* **30**, 295–300.
- Gomelsky, M., Biville, F., Gasser, F. and Tsygankov, Y. D.** (1996). Identification and characterization of the pqqDGC gene cluster involved in pyrroloquinoline quinone production in an obligate methylophilic *Methylobacillus flagellatum*. *FEMS Microbiology Letters* **141**, 169–176.
- Gomez, E., Ferreras, L. and Toresani, S.** (2006). Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application. *Bioresource Technology* **97**, 1484–1489.
- Gomez-Alvarez, V., Teal, T. K. and Schmidt, T. M.** (2009). Systematic artifacts in metagenomes from complex microbial communities. *The ISME Journal* **3**, 1314–1317.
- Gommeaux, M., Barakat, M., Montagnac, G., Christen, R., Guyot, F. and Heulin, T.** (2010). Mineral and Bacterial Diversities of Desert Sand Grains from South-East Morocco. *Geomicrobiology Journal* **27**, 76–92.
- Gonzalez, I., Laiz, L., Hermosin, B., Caballero, B., Incerti, C. and Saiz-Jimenez, C.** (1999). Bacteria isolated from rock art paintings: the case of Atlanterra shelter (south Spain). *Journal of Microbiological Methods* **36**, 123–127.
- Goosen, N., Vermaas, D. A. and van de Putte, P.** (1987). Cloning of the genes involved in synthesis of coenzyme pyrrolo-quinoline-quinone from *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Bacteriology* **169**, 303–307.
- Goosen, N., Horsman, H. P., Huinen, R. G. and van de Putte, P.** (1989). *Acinetobacter calcoaceticus* genes involved in biosynthesis of the coenzyme pyrrolo-quinoline-quinone: nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **171**, 447–455.
- Goosen, N., Huinen, R. G. and van de Putte, P.** (1992). A 24-amino-acid polypeptide is essential for the biosynthesis of the coenzyme pyrrolo-quinoline-quinone. *Journal of Bacteriology* **174**, 1426–1427.
- Gorbushina, A. A. and Broughton, W. J.** (2009). Microbiology of the Atmosphere-Rock Interface: How Biological Interactions and Physical Stresses Modulate a Sophisticated Microbial Ecosystem. *Annual Review of Microbiology* **63**, 431–450.
- Gordon, E. H., Page, M. D., Willis, A. C. and Ferguson, S. J.** (2000). *Escherichia coli* DipZ: anatomy of a transmembrane protein disulphide reductase in which three pairs of cysteine residues, one in each of three domains, contribute differentially to function. *Molecular Microbiology* **35**, 1360–1374.
- Gralnick, J. A. and Newman, D. K.** (2007). Extracellular respiration. *Molecular Microbiology* **65**, 1–11.
- Gray, N. D., Hastings, R. C., Sheppard, S. K., Loughnane, P., Lloyd, D., McCarthy, A. J. and Head, I. M.** (2003). Effects of soil improvement treatments on bacterial community structure and soil processes in an upland grassland soil. *FEMS Microbiology Ecology* **46**, 11–22.
- Grayston, S. J., Vaughan, D. and Jones, D.** (1996). Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Applied soil ecology* **5**, 29–56.
- Gregory, P. J. and Hinsinger, P.** (1999). New approaches to studying chemical and physical changes in the rhizosphere: an overview. *Plant and Soil* **211**, 1–9.
- Grindley, J. F., Payton, M. A., Van de Pol, H. and Hardy, K. G.** (1988). Conversion of glucose to 2-keto-L-gulonate, an intermediate in L-ascorbate synthesis, by a recombinant strain of *Erwinia citreus*. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 1770–1775.

- Gulati, A., Sharma, N., Vyas, P., Sood, S., Rahi, P., Pathania, V. and Prasad, R.** (2010). Organic acid production and plant growth promotion as a function of phosphate solubilization by *Acinetobacter rhizosphaerae* strain BIHB 723 isolated from the cold deserts of the trans-Himalayas. *Archives of Microbiology* **192**, 975–983.
- Hackl, E., Zechmeister-Boltenstern, S., Bodrossy, L. and Sessitsch, A.** (2004). Comparison of diversities and compositions of bacterial populations inhabiting natural forest soils. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 5057–5065.
- Haichar, F. el Z., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J. I., Prosser, J. I., Balesdent, J., Heulin, T. and Achouak, W.** (2008). Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal* **2**, 1221–1230.
- Hall, K.** (1997). Rock Temperatures and Implications for Cold Region Weathering. I: New Data from Viking Valley, Alexander Island, Antarctica. *Permafrost and Periglacial Processes* **8**, 69–90.
- Hall, K.** (1998). Rock temperatures and implications for cold region weathering. II: New data from Rothera, Adelaide Island, Antarctica. *Permafrost and Periglacial Processes* **9**, 47–55.
- Hall, K.** (1999). The role of thermal stress fatigue in the breakdown of rock in cold regions. *Geomorphology* **31**, 47–63.
- Hall, K. and André, M.-F.** (2001). New insights into rock weathering from high-frequency rock temperature data: an Antarctic study of weathering by thermal stress. *Geomorphology* **41**, 23–35.
- Hall, K., Guglielmin, M. and Strini, A.** (2008). Weathering of granite in Antarctica: II. Thermal stress at the grain scale. *Earth Surface Processes and Landforms* **33**, 475–493.
- Hallet, B.** (2006). GEOLOGY: Why Do Freezing Rocks Break ? *Science* **314**, 1092–1093.
- Hameeda, B., Reddy, Y., Rupela, O. P., Kumar, G. N. and Reddy, G.** (2006). Effect of Carbon Substrates on Rock Phosphate Solubilization by Bacteria from Composts and Macrofauna. *Current Microbiology* **53**, 298–302.
- Harden, V. P. and Harris, J. O.** (1953). THE ISOELECTRIC POINT OF BACTERIAL CELLS¹. *Journal Bacteriology* **65**, 198–202.
- Harley, A. D. and Gilkes, R. J.** (2000). Factors influencing the release of plant nutrient elements from silicate rock powders: a geochemical overview. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **56**, 11–36.
- Haynes, R. J.** (1990). Active ion uptake and maintenance of cation-anion balance: A critical examination of their role in regulating rhizosphere pH. *Plant and Soil* **126**, 247–264.
- Hernandez, M. E., Kappler, A. and Newman, D. K.** (2004). Phenazines and Other Redox-Active Antibiotics Promote Microbial Mineral Reduction. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 921–928.
- Herrera, A., Cockell, C. S., Self, S., Blaxter, M., Reitner, J., Arp, G., Dröse, W., Thorsteinsson, T. and Tindle, A. G.** (2008). Bacterial Colonization and Weathering of Terrestrial Obsidian in Iceland. *Geomicrobiology Journal* **25**, 25–37.
- Herrera, A., Cockell, C. S., Self, S., Blaxter, M., Reitner, J., Thorsteinsson, T., Arp, G., Dröse, W. and Tindle, A. G.** (2009). A cryptoendolithic community in volcanic glass. *Astrobiology* **9**, 369–381.
- Hersman, L., Lloyd, T. and Sposito, G.** (1995). Siderophore-promoted dissolution of hematite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **59**, 3327–3330.
- Heyrman, J. and Swings, J.** (2001). 16S rDNA sequence analysis of bacterial isolates from biodeteriorated mural paintings in the Servilia tomb (Necropolis of carmona, Seville, Spain). *Systematic Applied Microbiology* **24**, 417–422.
- Hiniker, A.** (2003). In Vivo Substrate Specificity of Periplasmic Disulfide Oxidoreductases. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 12967–12973.
- Hinsinger, P. and Jaillard, B.** (1993). Root-induced release of interlayer potassium and vermiculitization of phlogopite as related to potassium depletion in the rhizosphere of ryegrass. *Journal of Soil Science* **44**, 525–534.
- Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C. and Jaillard, B.** (2003). Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant and Soil* **248**, 43–59.
- Hodson, M. E., Langan, S. J. and Wilson, M. J.** (1996). A sensitivity analysis of the PROFILE model in relation to the calculation of soil weathering rates. *Applied geochemistry* **11**, 835–844.
- Holden, M. T. G., Titball, R. W., Peacock, S. J., Cerdeño-Tárraga, A. M., Atkins, T., Crossman, L. C., Pitt, T., Churcher, C., Mungall, K., Bentley, S. D., et al.** (2004). Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. *PNAS*. **101**, 14240–14245.
- Hong, S. H., Jeong, J., Shim, S., Kang, H., Kwon, S., Ahn, K. H. and Yoon, J.** (2008). Effect of electric currents on bacterial detachment and inactivation. *Biotechnology and Bioengineering* **100**, 379–386.

- Hoppener-Ogawa, S., Leveau, J. H. J., Smant, W., van Veen, J. A. and de Boer, W. (2007). Specific Detection and Real-Time PCR Quantification of Potentially Mycophagous Bacteria Belonging to the Genus *Collimonas* in Different Soil Ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 4191–4197.
- Hutchens, E. (2009). Microbial selectivity on mineral surfaces: possible implications for weathering processes. *Fungal Biology Reviews* **23**, 115–121.
- Hutchens, E., Gleeson, D., McDermott, F., Miranda-CasoLuengo, R. and Clipson, N. (2010). Meter-Scale Diversity of Microbial Communities on a Weathered Pegmatite Granite Outcrop in the Wicklow Mountains, Ireland; Evidence for Mineral Induced Selection? *Geomicrobiology Journal* **27**, 1–14.
- Hyman, E. D. (1988). A new method of sequencing DNA. *PNAS*. **174**, 423–436.
- Ignacio Rangel-Castro, J., Prosser, J. I., Scrimgeour, C. M., Smith, P., Ostle, N., Ineson, P., Meharg, A. and Killham, K. (2004). Carbon flow in an upland grassland: effect of liming on the flux of recently photosynthesized carbon to rhizosphere soil. *Global Change Biology* **10**, 2100–2108.
- Illmer, P. and Schinner, F. (1999). Influence of nutrient solution on Al-tolerance of *Pseudomonas* sp. *FEMS Microbiology Letters* **170**, 187–190.
- Ize, B., Porcelli, I., Lucchini, S., Hinton, J. C., Berks, B. C. and Palmer, T. (2004). Novel Phenotypes of *Escherichia coli* tat Mutants Revealed by Global Gene Expression and Phenotypic Analysis. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 47543–47554.
- Izumi, H., Cairney, J. W. G., Killham, K., Moore, E., Alexander, I. J. and Anderson, I. C. (2008). Bacteria associated with ectomycorrhizas of slash pine (*Pinus elliottii*) in south-eastern Queensland, Australia. *FEMS Microbiology Letters* **282**, 196–204.
- Jackson, M. W. and Plano, G. V. (1999). DsbA is required for stable expression of outer membrane protein YscC and for efficient Yop secretion in *Yersinia pestis*. *Journal of Bacteriology* **181**, 5126–5130.
- Jackson, T. and Voigt, G. (1971). Biochemical weathering of calcium-bearing minerals by rhizosphere micro-organisms, and its influence on calcium accumulation in trees. *Plant and Soil* **35**, 655–658.
- Jacob-Dubuisson, F., Pinkner, J., Xu, Z., Striker, R., Padmanabhan, A. and Hultgren, S. J. (1994). PapD chaperone function in pilus biogenesis depends on oxidant and chaperone-like activities of DsbA. *PNAS* **91**, 11552–11556.
- Jacobson, A. D. and Wu, L. (2009). Microbial dissolution of calcite at T = 28 °C and ambient pCO₂. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **73**, 2314–2331.
- Jagoutz, E. (2006). Salt-induced rock fragmentation on Mars : the role of salt in the weathering of martian rocks. *Advances in space research* **38**, 696-700.
- Jolivet, C., Angers, D. A., Chantigny, M. H., Andreux, F. and Arrouays, D. (2006). Carbohydrate dynamics in particle-size fractions of sandy spodosols following forest conversion to maize cropping. *Soil Biology and Biochemistry* **38**, 2834–2842.
- Jones, D. L. (1998). Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant and Soil* **205**, 25–44.
- Jones, D. L., Dennis, P. G., Owen, A. G. and van Hees, P. A. W. (2003). Organic acid behavior in soils – misconceptions and knowledge gaps. *Plant and Soil* **248**, 31–41.
- Jongmans, A. G., Breemen, N. van, Lundström, U., Hees, P. A. W. van, Finlay, R. D., Srinivasan, M., Unestam, T., Giesler, R., Melkerud, P.-A. and Olsson, M. (1997). Rock-eating fungi. *Nature* **389**, 682–683.
- Judas, M., Schauermann, J. and Meiwes, K.-J. (1997). The inoculation of *Lumbricus terrestris* L. in an acidic spruce forest after liming and its influence on soil properties. *Soil Biology and Biochemistry* **29**, 677–679.
- Jussy, J. H., Koerner, W., Dambrine, É., Dupouey, J. L. and Benoit, M. (2002). Influence of former agricultural land use on net nitrate production in forest soils. *European Journal of Soil Science* **53**, 367–374.
- Kadokura, H., Katzen, F. and Beckwith, J. (2003). Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annual Review of Biochemistry* **72**, 111–135.
- Kalinowski, B. , Liermann, L. , Brantley, S. , Barnes, A. and Pantano, C. . (2000). X-ray photoelectron evidence for bacteria-enhanced dissolution of hornblende. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **64**, 1331–1343.
- Kalinowski, B. E., Oskarsson, A., Albinsson, Y., Arlinger, J., Ödegaard-Jensen, A., Andlid, T. and Pedersen, K. (2004). Microbial leaching of uranium and other trace elements from shale mine tailings at Ranstad. *Geoderma* **122**, 177–194.

- Kan, J., Wang, Y., Obratsova, A., Rosen, G., Leather, J., Scheckel, K. G., Neilson, K. H. and Arias-Thode, Y. M. (2011). Marine microbial community response to inorganic and organic sediment amendments in laboratory mesocosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **74**, 1931–1941.
- Katzen, F., Deshmukh, M., Daldal, F. and Beckwith, J. (2002). Evolutionary domain fusion expanded the substrate specificity of the transmembrane electron transporter DsbD. *The EMBO journal* **21**, 3960–3969.
- Kelly, L. C., Cockell, C. S., Piceno, Y. M., Andersen, G. L., Thorsteinsson, T. and Marteinson, V. (2010). Bacterial Diversity of Weathered Terrestrial Icelandic Volcanic Glasses. *Microbial Ecology* **60**, 740–752.
- Kelly, L. C., Cockell, C. S., Herrera-Belaroussi, A., Piceno, Y., Andersen, G., DeSantis, T., Brodie, E., Thorsteinsson, T., Marteinson, V., Poly, F., et al. (2011). Bacterial Diversity of Terrestrial Crystalline Volcanic Rocks, Iceland. *Microbial Ecology* **62**, 69–79.
- Kennedy, N., Brodie, E., Connolly, J. and Clipson, N. (2004). Impact of lime, nitrogen and plant species on bacterial community structure in grassland microcosms. *Environmental Microbiology* **6**, 1070–1080.
- Kim, K. Y., Jordan, D. and Krishnan, H. B. (1998). Expression of genes from *Rahnella aquatilis* that are necessary for mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* **159**, 121–127.
- Kim, C. H., Han, S. H., Kim, K. Y., Cho, B. H., Kim, Y. H., Koo, B. S. and Kim, Y. C. (2003). Cloning and Expression of Pyrroloquinoline Quinone (PQQ) Genes from a Phosphate-Solubilizing Bacterium *Enterobacter intermedium*. *Current Microbiology* **47**,.
- Kim, Y.-H., Bae, B. and Chung, Y.-K. (2005). Optimization of biological phosphorus removal from contaminated sediments with phosphate-solubilizing microorganisms. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **99**, 23–29.
- Kleinschmidt, R., Hentschke, I. and Rothe, G. M. (1998). Effect of season and soil treatments on carbohydrate concentrations in Norway spruce (*Picea abies*) mycorrhizae. *Tree Physiology* **18**, 325–332.
- Koele, N., Turpault, M.-P., Hildebrand, E. E., Uroz, S. and Frey-Klett, P. (2009). Interactions between mycorrhizal fungi and mycorrhizosphere bacteria during mineral weathering: Budget analysis and bacterial quantification. *Soil Biology and Biochemistry* **41**, 1935–1942.
- Kohlmeier, S., Smits, T. H. M., Ford, R. M., Keel, C., Harms, H. and Wick, L. Y. (2005). Taking the Fungal Highway: Mobilization of Pollutant-Degrading Bacteria by Fungi. *Environmental Science & Technology* **39**, 4640–4646.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Steven Hill, D., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M. and Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175–176.
- Kranz, R., Lill, R., Goldman, B., Bonnard, G. and Merchant, S. (1998). Molecular mechanisms of cytochrome c biogenesis: three distinct systems. *Molecular Microbiology* **29**, 383–396.
- Kreutzer, K. (1995). Effects of forest liming on soil processes. *Plant and Soil* **168-169**, 447–470.
- Krishnaraj, P. and Goldstein, A. (2001). Cloning of a *Serratia marcescens* DNA fragment that induces quinoprotein glucose dehydrogenase-mediated gluconic acid production in *Escherichia coli* in the presence of stationary phase *Serratia marcescens*. *FEMS Microbiology Letters* **205**, 215–220.
- Kuchitsu, N., Ishizaki, T. and Nishiura, T. (2000). Salt weathering of the brick monuments in Ayutthaya, Thailand. *Engineering Geology* **55**, 91–99.
- Kuhlman, K. R., Allenbach, L. B., Ball, C. L., Fusco, W. G., La Duc, M. T., Kuhlman, G. M., Anderson, R. C., Stuecker, T., Erickson, I. K., Benardini, J., et al. (2005). Enumeration, isolation, and characterization of ultraviolet (UV-C) resistant bacteria from rock varnish in the Whipple Mountains, California. *Icarus* **174**, 585–595.
- Kumar, P., Sannigrahi, S., Scoullar, J., Kahler, C. M. and Tzeng, Y.-L. (2011). Characterization of DsbD in *Neisseria meningitidis*. *Molecular Microbiology* **79**, 1557–1573.
- Kunin, V., Engelbrekton, A., Ochman, H. and Hugenholtz, P. (2010). Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environmental Microbiology* **12**, 118–123.
- Lambkin, D. C., Gwilliam, K. H., Layton, C., Canti, M. G., Pearce, T. G. and Hodson, M. E. (2011). Production and dissolution rates of earthworm-secreted calcium carbonate. *Pedobiologia* **54**, S119–S129.
- Lane DJ. (1991). 16S/23S rRNA sequencing,. In Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (ed), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, pp 115–176 John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom.
- Landeweert, R., Hoffland, E., Finlay, R. D., Kuyper, T. W. and van Breemen, N. (2001). Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 248–254.

- Lapanje, A., Wimmersberger, C., Furrer, G., Brunner, I. and Frey, B.** (2012). Pattern of Elemental Release During the Granite Dissolution Can Be Changed by Aerobic Heterotrophic Bacterial Strains Isolated from Damma Glacier (Central Alps) Deglaciated Granite Sand. *Microbial Ecology* **63**, 865–882.
- Lea, P. J., Sodek, L., Parry, M. A. J., Shewry, P. R. and Halford, N. G.** (2007). Asparagine in plants. *Annals of Applied Biology* **150**, 1–26.
- Le Goaster, S., Dambrine, E., and Ranger J.** (1991) Croissance et nutrition minérale d'un peuplement d'épicéa sur sol pauvre. I- Evolution de la biomasse et dynamique d'incorporation d'éléments minéraux. *Acta Oecologia* **12**, 157-167
- Lejon, D. P. H., Chaussod, R., Ranger, J. and Ranjard, L.** (2005). Microbial Community Structure and Density Under Different Tree Species in an Acid Forest Soil (Morvan, France). *Microbial Ecology* **50**, 614–625.
- Lequy, É., Conil, S. and Turpault, M.-P.** (2012). Impacts of Aeolian dust deposition on European forest sustainability: A review. *Forest Ecology and Management* **267**, 240–252.
- Lerman, A. and Wu, L.** (2006). CO₂ and sulfuric acid controls of weathering and river water composition. *Journal of Geochemical Exploration* **88**, 427–430.
- Lessie, T. G. and Phibbs, P. V., Jr** (1984). Alternative pathways of carbohydrate utilization in pseudomonads. *Annual Review of Microbiology* **38**, 359–388.
- Leveau, J. H. J., Uroz, S. and de Boer, W.** (2010). The bacterial genus *Collimonas*: mycophagy, weathering and other adaptive solutions to life in oligotrophic soil environments. *Environmental Microbiology* **12**, 281–292.
- Lévy, G., Becker, M.** (1987). Silver fir dieback in the Vosges, France: fundamental role of water deficits. *Annales des Sciences Forestières*, **44**, 403-416.
- Lévy, S., Jaboyedoff, M., Locat, J. and Demers, D.** (2012). Erosion and channel change as factors of landslides and valley formation in Champlain Sea Clays: The Chacoura River, Quebec, Canada. *Geomorphology* **145-146**, 12–18.
- Leyval, C. and Berthelin, J.** (1989). Interactions between *Laccaria laccata*, *Agrobacterium radiobacter* and beech roots: Influence on P, K, Mg, and Fe mobilization from minerals and plant growth. *Plant and Soil* **117**, 103–110.
- Leyval, C. and Berthelin, J.** (1991). Weathering of a Mica by Roots and Rhizospheric Microorganisms of Pine. *Soil Science Society of America Journal* **55**, 1009–1016.
- Li, S.-L., Calmels, D., Han, G., Gaillardet, J. and Liu, C.-Q.** (2008). Sulfuric acid as an agent of carbonate weathering constrained by $\delta^{13}\text{CDIC}$: Examples from Southwest China. *Earth and Planetary Science Letters* **270**, 189–199.
- Liebeke, M., Brözel, V. S., Hecker, M. and Lalk, M.** (2009). Chemical characterization of soil extract as growth media for the ecophysiological study of bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* **83**, 161–173.
- Liermann, L. J., Guynn, R. L., Anbar, A. and Brantley, S. L.** (2005). Production of a molybdophore during metal-targeted dissolution of silicates by soil bacteria. *Chemical Geology* **220**, 285–302.
- Liermann, L. J., Kalinowski, B. E., Brantley, S. and Ferry, J.G.** (2000). Role of bacterial siderophores in dissolution of hornblende. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **64**, 587-602.
- Likens, G.E., Borman, F.H., Pierce, R.S., Eaton, J.S. and Johnson, N.M.** (1977). Biogeochemistry of a forest ecosystem. Springer, New York.
- Lin, T.-F., Huang, H.-I., Shen, F.-T. and Young, C.-C.** (2006). The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174. *Bioresource Technology* **97**, 957–960.
- Liu, S. T., Lee, L. Y., Tai, C. Y., Hung, C. H., Chang, Y. S., Wolfram, J. H., Rogers, R. and Goldstein, A. H.** (1992). Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101: nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone. *Journal of Bacteriology* **174**, 5814–5819.
- Liu, Z., Deng, D., Schutter, G. D. and Yu, Z.** (2011a). Micro-analysis of “salt weathering” on cement paste. *Cement and Concrete Composites* **33**, 179–191.
- Liu, D., Lian, B., Wang, B. and Jiang, G.** (2011b). Degradation of Potassium Rock by Earthworms and Responses of Bacterial Communities in Its Gut and Surrounding Substrates after Being Fed with Mineral. *PLoS ONE* **6**, e28803.
- Liu, W., He, Y., Zhang, K., Fan, J. and Cao, H.** (2012). [Isolation, identification and characterization of a strain of phosphate-solubilizing bacteria from red soil]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **52**, 326–333.
- Lower, S. K., Tadanier, C. J. and Hochella Jr, M.F.** (2000). Measuring interfacial and adhesion forces between bacteria and mineral surfaces with biological force microscopy. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **64**, 3133-3139.

- Lower, S. K.** (2001). Bacterial Recognition of Mineral Surfaces: Nanoscale Interactions Between *Shewanella* and alpha -FeOOH. *Science* **292**, 1360–1363.
- Luna, M. F., Bernardelli, C. E., Galar, M. L. and Boiardi, J. L.** (2006). Glucose Metabolism in Batch and Continuous Cultures of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 3. *Current Microbiology* **52**, 163–168.
- Lysnes, K., Thorseth, I. H., Steinsbu, B. O., VreĂs, L., Torsvik, T. and Pedersen, R. B.** (2004). Microbial community diversity in seafloor basalt from the Arctic spreading ridges. *FEMS Microbiology Ecology* **50**, 213–230.
- MacDonald, L. H., Moon, H. S. and Jaffé, P. R.** (2011). The role of biomass, electron shuttles, and ferrous iron in the kinetics of *Geobacter sulfurreducens*-mediated ferrihydrite reduction. *Water Research* **45**, 1049–1062.
- Madé, B.** (1991). Modélisation thermodynamique et cinétique des réactions géochimiques dans les interactions eau - roche. Institut de géologie - Strasbourg. U.F.R. Sciences de la Vie et de la Terre, Nancy
- Mahmood, S., Paton, G. I. and Prosser, J. I.** (2005). Cultivation-independent in situ molecular analysis of bacteria involved in degradation of pentachlorophenol in soil. *Environmental Microbiology* **7**, 1349–1360.
- Mailloux, B. J., Alexandrova, E., Keimowitz, A. R., Wovkulich, K., Freyer, G. A., Herron, M., Stolz, J. F., Kenna, T. C., Pichler, T., Polizzotto, M. L., et al.** (2009). Microbial Mineral Weathering for Nutrient Acquisition Releases Arsenic. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 2558–2565.
- Männistö, M. K. and Häggblom, M. M.** (2006). Characterization of psychrotolerant heterotrophic bacteria from Finnish Lapland. *Systematic and Applied Microbiology* **29**, 229–243.
- Mareschal L.** (2008). Effet des substitutions d'essences forestières sur l'évolution des sols et de leur mineralogie. Ph.D. thesis. Université Nancy Henri Poincaré, Nancy, France.
- Mareschal, L., Bonnaud, P., Turpault, M. P. and Ranger, J.** (2010). Impact of common European tree species on the chemical and physicochemical properties of fine earth: an unusual pattern. *European Journal of Soil Science* **61**, 14–23.
- Marschner, H., Häussling, M. and George, E.** (1991). Ammonium and nitrate uptake rates and rhizosphere pH in non-mycorrhizal roots of Norway spruce *Picea abies* (L.) Karst. *Trees - Structure and Function* **5**, 14–21.
- Marschner, P., Kandeler, E. and Marschner, B.** (2003). Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biology and Biochemistry* **35**, 453–461.
- Martin, F., Canet, D. and Marchal, J.P.** (1984). In vitro abundance ¹³C NMR studies of the carbohydrate storage in ectomycorrhizal fungi. *Physiogy Vegetal* **22**, 733-743.
- Mason, O. U., Meo-Savoie, C. A. D., Nostrand, J. D. V., Zhou, J., Fisk, M. R. and Giovannoni, S. J.** (2009). Prokaryotic diversity, distribution, and insights into their role in biogeochemical cycling in marine basalts. *The ISME Journal* **3**, 231–242.
- Matsuoka, N.** (2008). Frost weathering and rockwall erosion in the southeastern Swiss Alps: Long-term (1994–2006) observations. *Geomorphology* **99**, 353–368.
- Maurice, P. A., Vierkorn, M. A., Hersman, L. E. and Fulghum, J. E.** (2001). Dissolution of well and poorly ordered kaolinites by an aerobic bacterium. *Chemical Geology* **180**, 81–97.
- Mavridou, D. A. I., Stevens, J. M., Goddard, A. D., Willis, A. C., Ferguson, S. J. and Redfield, C.** (2008). Control of Periplasmic Interdomain Thiol:Disulfide Exchange in the Transmembrane Oxidoreductase DsbD. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 3219–3226.
- Mavridou, D. A. I., Ferguson, S. J. and Stevens, J. M.** (2012). The interplay between the disulfide bond formation pathway and cytochrome c maturation in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **586**, 1702–1707.
- McKay, C. P., Molaro, J. L. and Marinova, M. M.** (2009). High-frequency rock temperature data from hyper-arid desert environments in the Atacama and the Antarctic Dry Valleys and implications for rock weathering. *Geomorphology* **110**, 182–187.
- Medeiros, P. M., Fernandes, M. F., Dick, R. P. and Simoneit, B. R. T.** (2006). Seasonal variations in sugar contents and microbial community in a ryegrass soil. *Chemosphere* **65**, 832–839.
- Mergeay, M., Monchy, S., Vallaey, T., Auquier, V., Benotmane, A., Bertin, P., Taghavi, S., Dunn, J., Lelie, D. and Wattiez, R.** (2003). *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiology Reviews* **27**, 385–410.
- Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H. G., Gerits, J., Charles, P. and Van Gijsegem, F.** (1985). *Acaligenes eutrophus* CH34 is a facultative Chemolithotroph with plasmid-bond resistance to heavy metal. *Journal of Bacteriology* **162**, 328-334.

- Merriman, T. R. and Lamont, I. L.** (1993). Construction and use of a self-cloning promoter probe vector for Gram-negative bacteria. *Gene* **126**, 17–23.
- Metcalfe, A. C., Krsek, M., Gooday, G. W., Prosser, J. I. and Wellington, E. M. H.** (2002). Molecular Analysis of a Bacterial Chitinolytic Community in an Upland Pasture. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 5042–5050.
- Metheringham, R., Tyson, K. L., Croke, H., Missiakas, D., Raina, S. and Cole, J. A.** (1996). Effects of mutations in genes for proteins involved in disulphide bond formation in the periplasm on the activities of anaerobically induced electron transfer chains in *Escherichia coli* K12. *Molecular and General Genetics MGG* **253**, 95–102.
- Meulenbergh, J. J., Sellink, E., Riegman, N. H. and Postma, P. W.** (1992). Nucleotide sequence and structure of the *Klebsiella pneumoniae* pqq operon. *Molecular and General Genetics* **232**, 284–294.
- Meyer, J. M., Hohnadel, D. and Hallé, F.** (1989). Cepabactin from *Pseudomonas cepacia*, a new type of siderophore. *Journal of General Microbiology* **135**, 1479–1487.
- Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., Olson, R., Glass, E., Kubal, M., Paczian, T., Rodriguez, A., Stevens, R., Wilke, A., et al.** (2008). The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* **9**, 386.
- Miki, T.** (2004). Two Periplasmic Disulfide Oxidoreductases, DsbA and SrgA, Target Outer Membrane Protein SpiA, a Component of the *Salmonella* Pathogenicity Island 2 Type III Secretion System. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 34631–34642.
- Miller J.H.** (1992) A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- Miller, A. Z., Laiz, L., Dionísio, A., Macedo, M. F. and Saiz-Jimenez, C.** (2009a). Growth of phototrophic biofilms from limestone monuments under laboratory conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation* **63**, 860–867.
- Miller, S. H., Browne, P., Prigent-Combaret, C., Combes-Meynet, E., Morrissey, J. P. and O'Gara, F.** (2010). Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology Reports* **2**, 403–411.
- Minyard, M. L., Bruns, M. A., Martínez, C. E., Liermann, L. J., Buss, H. L. and Brantley, S. L.** (2011). Halloysite Nanotubes and Bacteria at the Saprolite–Bedrock Interface, Rio Icacos Watershed, Puerto Rico. *Soil Science Society of America Journal* **75**, 348.
- Monds, R. D., Newell, P. D., Schwartzman, J. A. and O'Toole, G. A.** (2006). Conservation of the Pho regulon in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 1910–1924.
- Moore-Kucera, J. and Dick, R. P.** (2008). PLFA profiling of microbial community structure and seasonal shifts in soils of a Douglas-fir chronosequence. *Microbiology Ecology* **55**, 500–511.
- Morris, C. J., Biville, F., Turlin, E., Lee, E., Ellermann, K., Fan, W. H., Ramamoorthi, R., Springer, A. L. and Lidstrom, M. E.** (1994). Isolation, phenotypic characterization, and complementation analysis of mutants of *Methylobacterium extorquens* AM1 unable to synthesize pyrroloquinoline quinone and sequences of pqqD, pqqG, and pqqC. *Journal Bacteriology* **176**, 1746–1755.
- Mossialos, D. and Amoutzias, G. D.** (2009). Role of siderophores in cystic fibrosis pathogenesis: Foes or friends? *International Journal of Medical Microbiology* **299**, 87–98.
- Mottershead, D. N., Baily, B., Collier, P. and Inkpen, R. J.** (2003). Identification and quantification of weathering by plant roots. *Building and Environment* **38**, 1235–1241.
- Murata, T., Tanaka, H., Yasue, S., Hamada, R., Sakagami, K. and Kurokawa, Y.** (1999). Seasonal variations in soil microbial biomass content and soil neutral sugar composition in grassland in the Japanese Temperate Zone. *Applied Soil Ecology* **11**, 253–259.
- Nambiar, E. K. S.** (1996). Sustained Productivity of Forests Is a Continuing Challenge to Soil Science. *Soil Science Society of America Journal* **60**, 1629–1642.
- Nautiyal, C. S.** (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* **170**, 265–270.
- Nautiyal, C. S., Bhadauria, S., Kumar, P., Lal, H., Mondal, R. and Verma, D.** (2000). Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiology Letters* **182**, 291–296.
- Neal, A., Bank, T., Hochella, M. and Rosso, K.** (2005). Cell adhesion of *Shewanella oneidensis* to iron oxide minerals: Effect of different single crystal faces. *Geochemical Transactions* **6**, 77.

- Neale, S. P., Shah, Z. and Adams, W. A.** (1997). Changes in microbial biomass and nitrogen turnover in acidic organic soils following liming. *Soil Biology and Biochemistry* **29**, 1463–1474.
- Nealson, K. H. and Stahl, D. H.** (1997). Microorganisms and biogeochemical cycles : What can we learn from stratified communities ? In *Geomicrobiology: Interactions between Microbes and Minerals*. pp. 391-428. Mineralogical Soc America, Washington.
- Neilands, J. B.** (1982). Microbial Envelope Proteins Related to Iron. *Annual Review of Microbiology* **36**, 285–309.
- Newman, D. K.** (2001). How Bacteria Breathe Minerals. *Science* **292**, 1312–1313.
- Norville, I. H., Breitbach, K., Eske-Pogodda, K., Harmer, N. J., Sarkar-Tyson, M., Titball, R. W. and Steinmetz, I.** (2011). A novel FK-506-binding-like protein that lacks peptidyl-prolyl isomerase activity is involved in intracellular infection and in vivo virulence of *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiology* **157**, 2629–2638.
- Nys, C.** (1989). Fertilizer application, forest decline and yield of Norway spruce (*Picea abies*) in the French Ardennes. *Revue forestière française*, **41**, 336-347.
- Offre, P., Pivato, B., Siblot, S., Gamalero, E., Corberand, T., Lemanceau, P. and Mougel, C.** (2007). Identification of Bacterial Groups Preferentially Associated with Mycorrhizal Roots of *Medicago truncatula*. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 913–921.
- Olsson, P. A. and Wallander, H.** (1998). Interactions between ectomycorrhizal fungi and the bacterial community in soils amended with various primary minerals. *FEMS Microbiology Ecology* **27**, 195–205.
- Olsson-Francis, K., Van Houdt, R., Mergeay, M., Leys, N. and Cockell, C. S.** (2010). Microarray analysis of a microbe-mineral interaction. *Geobiology* **8**, 446–456.
- Onofre-Lemus, J., Hernandez-Lucas, I., Girard, L. and Caballero-Mellado, J.** (2009). ACC (1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate) Deaminase Activity, a Widespread Trait in *Burkholderia* Species, and Its Growth-Promoting Effect on Tomato Plants. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 6581–6590.
- Ortega-Morales, O., Guezennec, J., Hernandez-Duque, G., Gaylarde, C. C. and Gaylarde, P. M.** (2000). Phototrophic Biofilms on Ancient Mayan Buildings in Yucatan, Mexico. *Current Microbiology* **40**, 81–85.
- Pasic, L., Kovce, B., Sket, B. and Herzog-Velikonja, B.** (2010). Diversity of microbial communities colonizing the walls of a Karstic cave in Slovenia. *FEMS Microbiology Ecology* **71**, 50–60.
- Palmer, T. and Berks, B. C.** (2012). The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nature Reviews Microbiology*, In press
- Paris, F., Botton, B. and Lapeyrie, F.** (1996). In vitro weathering of phlogopite by ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **179**, 141–150.
- Park, C. Y., Fenter, P., Zhang, Z., Cheng, L. W. and Sturchio, N. C.** (2004). Structure of fluoroapatite (100)-water interface by high-resolution X-ray reflectivity. *American Mineralogist* **89**, 1647–1654
- Paulsen, I. T., Press, C. M., Ravel, J., Kobayashi, D. Y., Myers, G. S. A., Mavrodi, D. V., DeBoy, R. T., Seshadri, R., Ren, Q., Madupu, R., et al.** (2005). Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nature Biotechnology* **23**, 873–878.
- Payne, G. W., Ramette, A., Rose, H. L., Weightman, A. J., Jones, T. H., Tiedje, J. M. and Mahenthalingam, E.** (2006). Application of a recA gene-based identification approach to the maize rhizosphere reveals novel diversity in *Burkholderia* species. *FEMS Microbiology Letters* **259**, 126–132.
- Pérez, E., Sulbarán, M., Ball, M. M. and Yarzabal, L. A.** (2007). Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biology and Biochemistry* **39**, 2905–2914.
- Pettersson, M. and Bååth, E.** (2003). Temperature-dependent changes in the soil bacterial community in limed and unlimed soil. *FEMS Microbiology Ecology* **45**, 13–21.
- Postma, J., Nijhuis, E. H. and Someus, E.** (2010). Selection of phosphorus solubilizing bacteria with biocontrol potential for growth in phosphorus rich animal bone charcoal. *Applied Soil Ecology* **46**, 464–469.
- Puente, M. E., Bashan, Y., Li, C. Y. and Lebsky, V. K.** (2004). Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biology* **6**, 629–642.
- Puente, M. E., Li, C. Y. and Bashan, Y.** (2009). Endophytic bacteria in cacti seeds can improve the development of cactus seedlings. *Environmental and Experimental Botany* **66**, 402–408.

- Rangel-Castro, J. I., Killham, K., Ostle, N., Nicol, G. W., Anderson, I. C., Scrimgeour, C. M., Ineson, P., Meharg, A. and Prosser, J. I.** (2005). Stable isotope probing analysis of the influence of liming on root exudate utilization by soil microorganisms. *Environmental Microbiology* **7**, 828–838.
- Rambelli, A.** (1973). The rhizosphere of mycorrhizae. In Marks GC and Kozlowski TT (ed.) *Ectomycorrhizae: their ecology and physiology*, pp. 299-343. Academic press, New York.
- Ranger, J. and Turpault, M.-P.** (1999). Input–output nutrient budgets as a diagnostic tool for sustainable forest management. *Forest Ecology and Management* **122**, 139–154.
- Ranger, J., Allie, S., Gelhaye, D., Pollier, B., Turpault, M.-P. and Granier, A.** (2002). Nutrient budgets for a rotation of a Douglas-fir plantation in the Beaujolais (France) based on a chronosequence study. *Forest Ecology and Management* **171**, 3–16.
- Ranger, J. and Gelhaye, D.** (2007). Effet de la substitution d'essence sur le fonctionnement et la durabilité des écosystèmes forestiers: l'apport des travaux pluridisciplinaires menés en forêt de Breuil Chenue-Morvan. *Revue Scientifique Bourgogne Nature Hors Série*, **3**, 91–114.
- Rawlings, D. E., Dew, D. and du Plessis, C.** (2003). Biomineralization of metal-containing ores and concentrates. *Trends in Biotechnology* **21**, 38–44.
- Richardson, A. E. and Simpson, R. J.** (2011). Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability Update on Microbial Phosphorus. *Plant Physiology* **156**, 989–996.
- Rinaldi, A.** (2006). Saving a fragile legacy. *EMBO reports* **7**, 1075–1079.
- Rineau, F. and Garbaye, J.** (2009). Does forest miming impact the enzymatic profiles of ectomycorrhizal communities through specialized fungal symbionts ? *Mycorrhizha* **19**, 493-500.
- Rineau, F. and Garbaye, J.** (2010). Effects of liming on ectomycorrhizal community structure in relation to soil horizons and tree hosts. *Fungal Ecology* **2**, 103–109.
- Rivault, F., Schons, V., Liébert, C., Burger, A., Sakr, E., Abdallah, M. A., Schalk, I. J. and Mislin, G. L. A.** (2006). Synthesis of functionalized analogs of pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Tetrahedron* **62**, 2247–2254.
- Robert, M. and Berthelin, J.** (1986). Role of biological and biochemical factors in soil mineral weathering. In *Interactions of soil minerals with natural organics and microbes*, Madison, Wisconsin USA Soil, pp 453-492, Science Society of America, **17**.
- Roberts, J.** (2004). Inhibition and enhancement of microbial surface colonization: the role of silicate composition. *Chemical Geology* **212**, 313–327.
- Robinson, C., Matos, C. F. R. O., Beck, D., Ren, C., Lawrence, J., Vasisht, N. and Mendel, S.** (2011). Transport and proofreading of proteins by the twin-arginine translocation (Tat) system in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1808**, 876–884.
- Rodriguez, H., Rossolini, G. M., Gonzalez, T., Li, J. and Glick, B. R.** (2000). Isolation of a Gene from *Burkholderia cepacia* IS-16 Encoding a Protein That Facilitates Phosphatase Activity. *Current Microbiology* **40**, 362–366.
- Rodriguez, H., Gonzalez, T., Goire, I. and Bashan, Y.** (2004). Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften* **91**, 552–555.
- Roesch, L. F. W., Fulthorpe, R. R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A. K. M., Kent, A. D., Daroub, S. H., Camargo, F. A. O., Farmerie, W. G. and Triplett, E. W.** (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME Journal* **1**, 283–290.
- Rogers, J. R. and Bennett, P. C.** (2004). Mineral stimulation of subsurface microorganisms: release of limiting nutrients from silicates. *Chemical Geology* **203**, 91–108.
- Rooney, D. C. and Clipson, N. J. W.** (2008). Phosphate Addition and Plant Species Alters Microbial Community Structure in Acidic Upland Grassland Soil. *Microbial Ecology* **57**, 4–13.
- Røsberg, I., Frank, J. and Stuanes, A. O.** (2006). Effects of liming and fertilization on tree growth and nutrient cycling in a Scots pine ecosystem in Norway. *Forest Ecology and Management* **237**, 191–207.
- Rosenberg, D. R. and Maurice, P. A.** (2003). Siderophore adsorption to and dissolution of kaolinite at pH 3 to 7 and 22°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **67**, 223–229.
- Saarsalmi, A., Tamminen, P., Kukkola, M. and Levula, T.** (2011). Effects of liming on chemical properties of soil, needle nutrients and growth of Scots pine transplants. *Forest Ecology and Management* **262**, 278–285.

- Santelli, C. M., Orcutt, B. N., Banning, E., Bach, W., Moyer, C. L., Sogin, M. L., Staudigel, H. and Edwards, K. J. (2008). Abundance and diversity of microbial life in ocean crust. *Nature* **453**, 653–656.
- Santelli, C. M., Edgcomb, V. P., Bach, W. and Edwards, K. J. (2009). The diversity and abundance of bacteria inhabiting seafloor lavas positively correlate with rock alteration. *Environmental Microbiology* **11**, 86–98.
- Sasaki, K., Tsunekawa, M., Ohtsuka, T. and Konno, H. (1998). The role of sulfur-oxidizing bacteria *Thiobacillus thiooxidans* in pyrite weathering. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **133**, 269–278.
- Sato, Y., Nishihara, H., Yoshida, M., Watanabe, M., Rondal, J. D. and Ohta, H. (2004). Occurrence of hydrogen-oxidizing *Ralstonia* species as primary microorganisms in the Mt. Pinatubo volcanic mudflow deposits. *Soil Science and Plant Nutrition* **50**, 855–861.
- Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jimenez, C., Piñar, G., Lubitz, W. and Röllike, S. (2004). Phylogenetic diversity of bacteria associated with Paleolithic paintings and surrounding rock walls in two Spanish caves (LlonÁN and La Garma). *FEMS Microbiology Ecology* **47**, 235–247.
- Schack-Kirchner, H. and Hildebrand, E. E. (1998). Changes in soil structure and aeration due to liming and acid irrigation. *Plant and Soil* **199**, 167–176.
- Schlesinger, W. H., Phippen, J. S., Wallenstein, M. D., Hofmockel, K. S., Klepeis, D. M. and Mahall, B.E. (2003). Community composition and photosynthesis by photoautotrophs under quartz pebbles, southern mojave desert. *Ecology*, **84**(12), 3222–3231.
- Schloss, P. D. and Handelsman, J. (2008). A statistical toolbox for metagenomics: assessing functional diversity in microbial communities. *BMC Bioinformatics* **9**, 34.
- Schnider, U., Keel, C., Voisard, C., Défago, G. and Haas, D. (1995). Tn5-directed cloning of pqq genes from *Pseudomonas fluorescens* CHA0: mutational inactivation of the genes results in overproduction of the antibiotic pyoluteorin. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3856–3864.
- Schwarzenbacher, R., Stenner-Liewen, F., Liewen, H., Reed, J. C. and Liddington, R. C. (2004). Crystal structure of PqqC from *Klebsiella pneumoniae* at 2.1 Å resolution. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **56**, 401–403.
- Seguin, V., Courchesne, F., Gagnon, C., Martin, R.R., Naftel, S.J. and Skinner, W. (2005). Mineral-weathering in the rhizosphere of forested soils. Chap. 2. In: Huang, P.M., Gobran, G.R. (Eds.), *Biogeochemistry of Trace Elements in the Rhizosphere*, pp. 29–55.
- Selwitz, R. H., Ismail, A. I. and Pitts, N. B. (2007). Dental caries. *The Lancet* **369**, 51–59.
- Seshadri, T. (1944). A theory of biogenesis of lichen depsides and depsidones. *Proceedings Mathematical Sciences* **20**, 1–14.
- Sheoran, A. S., Sheoran, V. and Choudhary, R. P. (2010). Bioremediation of acid-rock drainage by sulphate-reducing prokaryotes: A review. *Minerals Engineering* **23**, 1073–1100.
- Sheppard, S. K. and Lloyd, D. (2002). Effects of soil amendment on gas depth profiles in soil monoliths using direct mass spectrometric measurement. *Bioresource Technology* **84**, 39–47.
- Smits, M. M., Hoffland, E., Jongmans, A. G. and van Breemen, N. (2005). Contribution of mineral tunneling to total feldspar weathering. *Geoderma* **125**, 59–69.
- Sokol, P. A., Darling, P., Woods, D. E., Mahenthalingam, E. and Kooi, C. (1999). Role of Ornibactin Biosynthesis in the Virulence of *Burkholderia cepacia*: Characterization of pvdA, the Gene Encoding L-OrnithineN 5-Oxygenase. *Infection and immunity* **67**, 4443–4455.
- Song, W., Ogawa, N., Oguchi, C. T., Hatta, T. and Matsukura, Y. (2007). Effect of *Bacillus subtilis* on granite weathering: A laboratory experiment. *Catena* **70**, 275–281.
- Sridevi, G., Minocha, R., Turlapati, S. A., Goldfarb, K. C., Brodie, E. L., Tisa, L. S. and Minocha, S. C. (2012). Soil bacterial communities of a calcium-supplemented and a reference watershed at the Hubbard Brook Experimental Forest (HBEF), New Hampshire, USA. *FEMS Microbiology Ecology* **79**, 728–740.
- Srividya, S., Soumya, S. and Pooja, K. (2009). Influence of environmental factors and salinity on phosphate solubilization by a newly isolated *Aspergillus niger* F7 from agricultural soil. *African Journal of Biotechnology*, **8**(9), 1864–1870.
- Starkey, R. L. (1958). INTERRELATIONS BETWEEN MICROORGANISMS AND PLANT ROOTS IN THE RHIZOSPHERE. *Bacteriology Reviews* **22**, 154–172.
- Stevens, J. M., Daltrop, O., Allen, J. W. A. and Ferguson, S. J. (2004). C-type Cytochrome Formation: Chemical and Biological Enigmas. *Accounts of Chemical Research* **37**, 999–1007.

- Stevens, J. M., Mavridou, D. A. I., Hamer, R., Kritsiligkou, P., Goddard, A. D. and Ferguson, S. J.** (2011). Cytochrome c biogenesis System I. *FEBS Journal* **278**, 4170–4178.
- Stone, A. T.** (1997). Reactions of extracellular organic ligands with dissolved metal ions and mineral surfaces 1997 In *Geomicrobiology: Interactions between Microbes and Minerals*. pp. 391–428. Mineralogical Soc America, Washington.
- Suzuki, M. T. and Giovannoni, S. J.** (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 625–630.
- Suzuki, Y., Matsubara, T. and Hoshino, M.** (2003). Breakdown of mineral grains by earthworms and beetle larvae. *Geoderma* **112**, 131–142.
- Sverdrup, H. and Warfvinge, P.** (1990). The role of weathering and forestry in determining the acidity of Lakes in Sweden. *Water, Air, & Soil Pollution* **52**, 71–78.
- Sverdrup H. U.** (1990). The kinetics of base cation release due to chemical weathering. PhD thesis.
- Sverdrup, H. U. and Warfvinge, P.** (1993). Calculating field weathering rates using a mechanistic geochemical model PROFILE. *Applied Biochemistry* **8**, 273–283.
- Sverdrup, H. and Warfvinge, P.** (1995). Estimating field weathering rates using laboratory kinetics. In: White, A.F., Brantley, S.L. (eds), *Chemical Weathering Rates of Silicate Minerals. Reviews in Mineralogy*, **31**. pp. 485–541, Mineralogical Society of America, Washington D.C.
- Sverdrup, H.** (2009). Chemical weathering of soil minerals and the role of biological processes. *Fungal Biology Reviews* **23**, 94–100.
- Tanaka, M. and Hirokane, Y.** (2000). Oxidation of aromatic aldehyde to aromatic carboxylic acid by Burkholderia cepacia TM1 isolated from humus. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **90**, 341–343.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673–4680.
- Thorseth, I. H., Furnes, H. and Heldal, M.** (1992). The importance of microbiological activity in the alteration of natural basaltic glass. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **56**, 845–850.
- Tisdall, J. M.** (1994). Possible role of soil microorganisms in aggregation in soils. *Plant and soil* **159**, 115–12.
- Toro, M., Azcon, R. and Barea, J.** (1997). Improvement of Arbuscular Mycorrhiza Development by Inoculation of Soil with Phosphate-Solubilizing Rhizobacteria To Improve Rock Phosphate Bioavailability ((sup32)P) and Nutrient Cycling. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 4408–4412.
- Tsuya, T., Ferri, S., Fujikawa, M., Yamaoka, H. and Sode, K.** (2006). Cloning and functional expression of glucose dehydrogenase complex of Burkholderia cepacia in Escherichia coli. *Journal of Biotechnology* **123**, 127–136.
- Tuanyok, A., Kim, H. S., Nierman, W. C., Yu, Y., Dunbar, J., Moore, R. A., Baker, P., Tom, M., Ling, J. M. L. and Woods, D. E.** (2005). Genome-wide expression analysis of iron regulation in Burkholderia pseudomallei and Burkholderia mallei using DNA microarrays. *FEMS Microbiology Letters* **252**, 327–335.
- Turpault, M.-P., Gobran, G. R. and Bonnaud, P.** (2007). Temporal variations of rhizosphere and bulk soil chemistry in a Douglas fir stand. *Geoderma* **137**, 490–496.
- Turpault, M. P., Nys, C. and Calvaruso C.** (2009). Rhizosphere impact on the dissolution of test minerals in a forest ecosystem. *Geoderma* **153**, 147–154.
- Tyler, G. and Olsson, T.** (2001). Plant uptake of major and minor mineral elements as influenced by soil acidity and liming. *Plant and Soil* **230**, 307–321.
- Uroz, S. and Frey-Klett, P.** (2011). Linking diversity to function: highlight on the mineral weathering bacteria. *Central European Journal of Biology* **6**, 817–820.
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M. P., Pierrat, J. C., Mustin, C. and Frey-Klett, P.** (2007). Effect of the Mycorrhizosphere on the Genotypic and Metabolic Diversity of the Bacterial Communities Involved in Mineral Weathering in a Forest Soil. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 3019–3027.
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M. P., Sarniguet, A., de Boer, W., Leveau, J. H. J. and Frey-Klett, P.** (2009). Efficient mineral weathering is a distinctive functional trait of the bacterial genus Collimonas. *Soil Biology and Biochemistry* **41**, 2178–2186.

- Uroz, S., Turpault, M.-P., Van Scholl, L., Palin, B. and Frey-Klett, P. (2011a). Long term impact of mineral amendment on the distribution of the mineral weathering associated bacterial communities from the beech *Scleroderma citrinum* ectomycorrhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* **43**, 2275–2282.
- Uroz, S., Oger, P., Lepleux, C., Collignon, C., Frey-Klett, P. and Turpault, M.-P. (2011b). Bacterial weathering and its contribution to nutrient cycling in temperate forest ecosystems. *Research in Microbiology* **162**, 820–831.
- Uroz, S., Turpault, M. P., Delaruelle, C., Mareschal, L., Pierrat, J.-C. and Frey-Klett, P. (2012). Minerals Affect the Specific Diversity of Forest Soil Bacterial Communities. *Geomicrobiology Journal* **29**, 88–98.
- van Breemen, N., Finlay, R., Lundström, U., Jongmans, A. G., Giesler, R. and Olsson, M. (2000). Mycorrhizal weathering: A true case of mineral plant nutrition ? *Biogeochemistry* **49**, 53–67.
- van der Borden, A. J., van der Werf, H., van der Mei, H. C. and Busscher, H. J. (2004). Electric Current-Induced Detachment of *Staphylococcus epidermidis* Biofilms from Surgical Stainless Steel. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 6871–6874.
- van der Putten, W. H., de Ruiter, P. C., Martijn Bezemer, T., Harvey, J. A., Wassen, M. and Wolters, V. (2004). Trophic interactions in a changing world. *Basic and Applied Ecology* **5**, 487–494.
- van Schöll, L., Kuyper, T., Smits, M., Landeweert, R., Hoffland, E. and Breemen, N. (2008). Rock-eating mycorrhizas: their role in plant nutrition and biogeochemical cycles. *Plant and Soil* **303**, 35–47.
- Vandamme, P. et Coenye, T. (2004). Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *International Journal of System and Evolutionary Microbiology* **54**, 2285–2289.
- Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M. E., Lopez-Cortes, A. and Bashan, Y. (2000). Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils* **30**, 460–468.
- Vial, L., Groleau, M.-C., Dekimpe, V. and Déziel, E. (2007). Burkholderia diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. *Journal of Microbiological Biotechnology* **17**, 1407–1429.
- Viallard, V., Poirier, I., Cournoyer, B., Haurat, J., Wiebkin, S., Ophel-Keller, K. and Balandreau, J. (1998). *Burkholderia graminis* sp. nov., a rhizospheric *Burkholderia* species, and reassessment of [*Pseudomonas*] phenazinium, [*Pseudomonas*] pyrrocinia and [*Pseudomonas*] glathei as *Burkholderia*. *International journal of systematic bacteriology* **48**, 549–563.
- Wakelin, S. A., Anand, R. R., Reith, F., Gregg, A. L., Noble, R. R. P., Goldfarb, K. C., Andersen, G. L., DeSantis, T. Z., Piceno, Y. M. and Brodie, E. L. (2012). Bacterial communities associated with a mineral weathering profile at a sulphidic mine tailings dump in arid Western Australia. *FEMS microbiology ecology*.
- Wallander, H. (2000). Uptake of P from apatite by *Pinus sylvestris* seedlings colonised by different ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **218**, 249–256.
- Wallman, P., Svensson, M. G. E., Sverdrup, H. and Belyazid, S. (2005). ForSAFE—an integrated process-oriented forest model for long-term sustainability assessments. *Forest Ecology and Management* **207**, 19–36.
- Wang, X., Li, Q., Hu, H., Zhang, T. and Zhou, Y. (2005). Dissolution of kaolinite induced by citric, oxalic, and malic acids. *Journal of Colloid and Interface Science* **290**, 481–488.
- Wang, Ma, G.-Y., He, L.-Y. and Sheng, X.-F. (2011). Characterization of bacterial community inhabiting the surfaces of weathered bricks of Nanjing Ming city walls. *Science of The Total Environment* **409**, 756–762.
- Wang, Z., Xie, X. and Liu, J. (2012). Experimental measurements of short-term adsorption of *Acidithiobacillus ferrooxidans* onto chalcocopyrite. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* **22**, 442–446.
- Warscheid, T. and Braams, J. (2000). Biodeterioration of stone: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation* **46**, 343–368.
- Watarai, M., Tobe, T., Yoshikawa, M. and Sasakawa, C. (1995). Disulfide oxidoreductase activity of *Shigella flexneri* is required for release of Ipa proteins and invasion of epithelial cells. *PNAS* **92**, 4927–4931.
- Watteau, F. and Berthelin, J. (1994). Microbial dissolution of iron and aluminium from soil minerals: efficiency and specificity of hydroxamate siderophores compared to aliphatic acids. *European Journal of Soil Biology* **30**, 1-9.
- Weiss, J. V., Emerson, D. and Megonigal, J. P. (2004). Geochemical control of microbial Fe(II) reduction potential in wetlands: comparison of the rhizosphere to non-rhizosphere soil. *FEMS Microbiology Ecology* **48**, 89-100.
- Welch, S. A. and Ullman, W. J. (1996). Feldspar dissolution in acidic and organic solutions: Compositional and pH dependence of dissolution rate. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **60**, 2939–2948.
- Welch, S. A. and Ullman, W. J. (1999). The effect of microbial glucose metabolism on bytownite feldspar dissolution rates between 5° and 35°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **63**, 3247–3259.

- Welch, S. A., Barker, W. W. and Banfield, J. F. (1999). Microbial extracellular polysaccharides and plagioclase dissolution. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **63**, 1405–1419.
- Welch, S. A., Taunton, A. E. and Banfield, J. F. (2002). Effect of Microorganisms and Microbial Metabolites on Apatite Dissolution. *Geomicrobiology Journal* **19**, 343–367.
- Westall, F., de Wit, M. J., Dann, J., van der Gaast, S., de Ronde, C. E. . and Gerneke, D. (2001). Early Archean fossil bacteria and biofilms in hydrothermally-influenced sediments from the Barberton greenstone belt, South Africa. *Precambrian Research* **106**, 93–116.
- White A.F. (1995). Chemical weathering rates of silicate minerals in soils. In: White, A. F. and Brantley, S. L. Eds., *Chemical Weathering Rates of Silicates Minerals*. Mineralogical Society of America.
- Wierzchos, J., Davila, A. F., Artieda, O., Cámara-Gallego, B., de los Ríos, A., Neilson, K. H., Valea, S., Teresa García-González, M. and Ascaso, C. (2012). Ignimbrite as a substrate for endolithic life in the hyper-arid Atacama Desert: Implications for the search for life on Mars. *Icarus*. In press.
- Wightman, P. and Fein, J. (2004). The effect of bacterial cell wall adsorption on mineral solubilities. *Chemical Geology* **212**, 247–254.
- Wilson, M. J. (2004). Weathering of the primary rock-forming minerals: processes, products and rates. *Clay Minerals* **39**, 233–266.
- Wilson, M. S., Herrick, J. B., Jeon, C. O., Hinman, D. E. and Madsen, E. L. (2003). Horizontal Transfer of phnAc Dioxygenase Genes within One of Two Phenotypically and Genotypically Distinctive Naphthalene-Degrading Guilds from Adjacent Soil Environments. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 2172–2181.
- Wu, L., Jacobson, A. D., Chen, H.-C. and Hausner, M. (2007). Characterization of elemental release during microbe–basalt interactions at T=28°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **71**, 2224–2239.
- Wu, L., Jacobson, A. D. and Hausner, M. (2008). Characterization of elemental release during microbe–granite interactions at T=28°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **72**, 1076–1095.
- Xue, D., Huang, X., Yao, H. and Huang, C. (2010). Effect of lime application on microbial community in acidic tea orchard soils in comparison with those in wasteland and forest soils. *Journal of Environmental Sciences* **22**, 1253–1260.
- Yamada, M., Sumi, K., Matsushita, K., Adachi, O. and Yamada, Y. (1993). Topological analysis of quinoprotein glucose dehydrogenase in *Escherichia coli* and its ubiquinone-binding site. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 12812–12817.
- Yamaoka, H., Ferri, S. and Sode, M. F. K. (2004). Essential role of the small subunit of thermostable glucose dehydrogenase from *Burkholderia cepacia* *Biotechnology Letters* **26**, 1757–1761.
- Yan, F. (2002). Adaptation of H⁺-Pumping and Plasma Membrane H⁺ ATPase Activity in Proteoid Roots of White Lupin under Phosphate Deficiency. *Plant Physiology* **129**, 50–63.
- Yang, H. M., Chaowagul, W. and Sokol, P. A. (1991). Siderophore production by *Pseudomonas pseudomallei*. *Infect Immun* **59**, 776–780.
- Yee, N., Fein, J. B. and Daughney, C. J. (2000). Experimental study of the pH, ionic strength, and reversibility behavior of bacteria–mineral adsorption. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **64**, 609–617.
- Yu, J., Edwards-Jones, B., Neyrolles, O. and Kroll, J. S. (2000). Key role for DsbA in cell-to-cell spread of *Shigella flexneri*, permitting secretion of Ipa proteins into interepithelial protrusions. *Infection and Immunity* **68**, 6449–6456.
- Yuan, L., Huang, J., Li, X. and Christie, P. (2004). Biological mobilization of potassium from clay minerals by ectomycorrhizal fungi and eucalypt seedling roots. *Plant and Soil* **262**, 351–361.
- Zeller, B., Recous, S., Kunze, M., Moukoui, J., Colin-Belgrand, M., Bienaimé, S., Ranger, J. and Dambrine, E. (2007). Influence of tree species on gross and net N transformations in forest soils. *Annals of Forest Science* **64**, 151–158.
- Zhang, H.-Z. and Sonnenberg, M. S. (1996). DsbA is required for stability of the type IV pilin of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **21**, 787–797.
- Zhaoyu, Z. (2004). A river erosion estimate on the Loess Plateau: a case study from Luohe River, a second-order tributary of the Yellow River. *Global and Planetary Change* **41**, 215–220.
- Zhou, J., Kang, S., Schadt, C. W. and Garten, C. T. (2008). Spatial scaling of functional gene diversity across various microbial taxa. *PNAS* **105**, 7768–7773.
- Zhou, J., Wu, L., Deng, Y., Zhi, X., Jiang, Y.-H., Tu, Q., Xie, J., Van Nostrand, J. D., He, Z. and Yang, Y. (2011). Reproducibility and quantitation of amplicon sequencing-based detection. *ISME J* **5**, 1303–1313.

Zöttl, H. W., Mies, E. (1983). Nähelementversorgung und schastoffbelastung von fichtenökosystemen in Suidschwarzwald unter immissionseinfluss. *Mitteilungen der Duetschen bodenkundliche gesellschaft*, **38**, 429-433.

ANNEXES

TABLE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : PROCEDURES BIOINFORMATIQUES

ANNEXE 2 : PROTOCOLES

ANNEXE 3 : COMPOSITION DES MILIEUX

ANNEXE 4 : LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS ISSUS DE CE TRAVAIL

ANNEXE 1 : PROCEDURES BIOINFORMATIQUES

ROUTINE MOTHUR

Applications/mothur\85/mothur
Applications/mothur ; exit; (pour la version 1.8)

```
grep -c ">" *.fa  
grep ">" MIN.fa > MIN.group
```

BEdit: (ouvrir MIN.group)
remplacer > par rien (cocher grep)
remplacer \r par \tMIN\r

```
cat MIN.group > MIN.groups  
cat MIN.fa > MIN.fasta
```

```
mothur > unique.seqs(fasta=/Users/MIN.fasta)\  
mothur > align.seqs(candidate=/Users/MIN.unique.fasta, template=/Users\85.core_set_aligned.imputed.fasta,  
ksize=9, align=needleman, gapopen=-1)  
mothur > filter.seqs(fasta=/Users/MIN.unique.align, vertical=T)  
mothur > dist.seqs(fasta=/Users/MIN.unique.filter.fasta, cutoff=0.10, processors=2)  
moteur > read.dist(column=/Users/MIN.unique.filter.dist, name=MIN.names) ==>> étape inutile pour version de  
mothur supérieure à 1.18.0, passer directement à cluster  
mothur > cluster()  
mothur > read.otu(list=Users/MIN.unique.filter.fn.list, group=MIN.groups, label=unique-0.03-0.05-0.10)  
mothur > read.otu(rabund=/Users/MIN.unique.filter.MIN.rabund)  
mothur > summary.single(calc=nseqs-sobs-ace-chao-shannon)  
mothur > rarefaction.single(freq=100)
```

R (courbes de rarefaction)

```
data<-read.table(file="MIN.unique.filter.fn.rarefaction", header=T)  
plot(x=data$numsampled, y=data$unique, xlab="Number of Tags sampled", ylab="OTUs", type="l", col="black",  
font.lab=3)  
points(x=data$numsampled, y=data$X0.03, type="l", col="blue")  
points(x=data$numsampled, y=data$X0.05, type="l", col="red")  
points(x=data$numsampled, y=data$X0.10, type="l", col="green")  
legend(x=50000, y=1500, c("unique", "0.03", "0.05", "0.10"), c("black", "blue", "red", "green"))
```

Pour avoir une séquence représentative par OTU:

```
mothur > get.oturep(column=/Users/cendrella/Desktop/RUNepu/MIN8/MIN8.unique.filter.dist,  
name=/Users/cendrella/Desktop/RUNepu/MIN8/MIN8.names,  
fasta=Users/cendrella/Desktop/RUNepu/MIN8/MIN8.unique.fasta,  
list=/Users/cendrella/Desktop/RUNepu/MIN8/MIN8.unique.filter.fn.list, label=0.03, sorted=size)
```

(2 fichiers générés => MIN.rep.fasta et MIN.rep.names le fichier .rep.fasta contient les séquences, les Données sont classées des OTUs contenant le moins de séquences à ceux en contenant le plus)

Multi-samples analysis (pour analyser plusieurs sets de séquences en même temps: par exemple tous les échantillons de l'apatite)

```
grep -c ">" *.fa  
grep ">" MIN.fa > MIN.group  
BEdit ou tex wrangler: (ouvrir MIN.group)  
remplacer > par rien (cocher grep)  
remplacer \r par \tnomde l'echantillon\r
```

```
cat *.group > MIN.groups  
cat *.fa > MIN.fasta
```

Puis suivre la même procédure que pour une analyse avec un set de séquence

shared

```
mothur > venn(calc=shredsobs-sharedchao, groups=FS312-FS396, label=0.10)  
mothur > tree.shared(calc=jest-thetayc)  
mothur > read.otu(shared=sogin.unique.filter.fn.shared)  
mothur > rarefaction.shared()  
mothur > read.otu(list=patient70.fn.list, group=patient70.tissue_stool.groups)  
mothur > summary.shared(entrer les commandes voulues : shredsobs, sharedace, sharedchao)  
mothur > heatmap.bin(scale=log2, label=0.03)  
mothur > get.sharedseqs(list=abrecovery.fn.list, group=abrecovery.groups, label=0.04, shared=A-B)  
mothur > get.sharedseqs(list=abrecovery.fn.list, group=abrecovery.groups, label=0.04, unique=A-B)
```

Choisir le nombre de séquences:

Permet de réduire le nombre de séquences pour avoir le même nombre de séquences pour chaque échantillon
(Ici le plus petit set de séquence contient 31666 séquences)\
sub.sample(fasta=MIN.fasta, size=31666)

ROUTINE PHYLIP

```
C:\phylip3.65\dnadist
H:\nom.phy (si besoin table de similarité appuyer sur D puis Y)
Y
rename outfile nomdnadist1
C:\phylip3.65\nighbor
nomdnadist1
Y
rename outfile nomneighbor1
rename outtree nomtree1
C:\phylip3.65\seqboot
H:\nom.phy
R 100 (ou 1000) Y 23
rename outfile nomseqboot1
C:\phylip3.65\dnadist
nomseqboot1
M D 100 (ou 1000)
rename outfile nomdnadist2
C:\phylip3.65\nighbor
nomdnadist2
M 100 23 Y
rename outfile nomneighbor2
rename outtree nomtree2
C:\phylip3.65\consense
Nomtree2 Y
rename outtree nomtree3
```

ROUTINE ADE4

- Copier les données dans **trois documents** différents sous excel :
 - Un avec les **valeurs** (!Les virgules doivent être remplacées par des points!)
 - Un avec les **intitulés des colonnes** (les noms doivent être enregistrés en une seule colonne)
 - Un avec les **intitulés des lignes** (les noms doivent être enregistrés en une seule colonne)
- Les “enregistrer sous” avec le format “Texte(séparateur:tabulation).txt”
- **NB:** il est conseillé de faire un dossier sur le bureau pour réunir les trois documents (Que l’on peut nommer *Values.txt*, *Colonne.txt* et *Ligne.txt* par exemple)
- Ouvrir le module **ADE4-Compute** (icône éléphant)
- Aller dans « Modules » puis dans « Files utilities » et enfin dans « Texttobin » :
 - *Text input file* : Aller chercher le fichier « *Values.txt* »
 - *Binary output file* : écrire « *ValuesBIN* » (le plus important étant de mettre « BIN »)
 - « Quit »
 - « OK »(pour enregistrer)
- Ouvrir le module **ADE4-Compute** (icône éléphant)
- Aller dans « Modules » puis « One table analyses » et enfin dans « COA » :
 - *Data file* : Aller chercher le fichier « *ValuesBIN* ».
 - « OK »
 - « Quit » et « OK » (pour enregistrer)
- Le programme a généré **plusieurs fichiers** et notamment des *.fcc* et *.fcl* qui correspondent aux **données en colonnes (.fcc) et en lignes (.fcl)**
- Ouvrir le module **ADE4-Graph** (icône léopard) :
 - *XY coordinates file* : aller chercher le fichier « *ValuesBIN.fcc* »
 - *Label file (or #) for items* : aller chercher le fichier « *Colonne.txt* » (= celui qui contient les intitulés des **colonnes**)
 - « OK » (Non non, on ne met rien dans les autres cases ^^)
 - Une fois le graphique réalisé aller dans « Window » puis dans « Min & max »
 - Régler les échelles « *Min. abscissa* », « *Max. abscissa* », « *Min. ordinate* » et « *Max. ordinate* » de façon à ce que tous les points soient visibles sur le graphique (« Draw » pour appliquer les changements d’échelle)
 - Noter sur une feuille de brouillon les échelles retenues (Recopier la petite croix en haut à droite du graphique).
 - Fermer le module **ADE4-Graph** puis le relancer.
 - Cette fois-ci choisir le fichier « *ValuesBIN.fcl* » et « *Ligne.txt* » (= celui qui contient les intitulés des **lignes**) et « OK »
 - Régler de la même façon les échelles et les noter sur une feuille
 - Fermer le module
- Comparer les deux échelles obtenues et retenir **la plus grande**.
- Relancer le module **ADE4-Graph** et refaire un graphique à la fois **en appliquant l’échelle la plus grande**.
- Lorsque le graphique obtenu convient : Aller dans « File » puis dans « Save as... » et lui donner un nom (par exemple « *Graph colonne* »). Il sera enregistré en « *.pict* »
- Faire de même avec le deuxième graph.
- Et maintenant il faut trouver quelqu’un disposant d’un programme capable de lire les fichiers « *.pict* » (par exemple Adobe Illustrator...) afin de pouvoir superposer les deux graphiques.

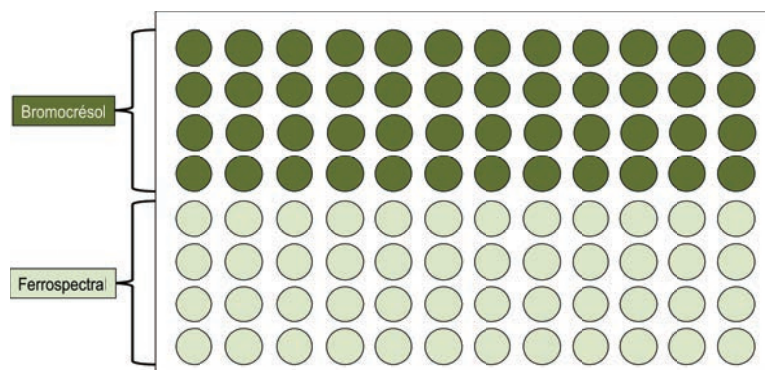
ANNEXE 2 : PROTOCOLES

PROCOLE N°1 : TESTS FONCTIONNELS EN GOUTTES

- Faire une culture de la souche à tester dans 10 mL milieu et dans conditions d'incubation qui conviennent (pour les souches de cette étude : 10 mL de milieu LBm à 25C° pendant 2j). Prévoir un témoin positif [PML1(12)]
- Récupérer 2 mL de milieu dans un eppendorf (pour des souches qui ne poussent pas bien, prévoir plusieurs tubes)
- Centrifuger les cellules pendant 10min à 13 000rpm
- Jeter le surnageant (attention aux micros éclaboussures lors du traitement de plusieurs souches à la fois et attention à ne pas « perdre » le culot)
- Resuspendre le culot dans 2 mL d'eau mQ stérile
- Centrifuger 10min à 13 000rpm
- Jeter le surnageant
- Resuspendre le culot dans 2 mL d'eau mQ stérile (s'il y a plusieurs tubes pour une souche, les réunir en un seul)
- Centrifuger 10min à 13 000rpm
- Refaire un lavage avec 2 mL d'eau stérile
- Resuspendre le culot dans « la dernière goutte »
- Ajouter entre 50 µL et 100 µL de suspension dans un tube à hémolyse préalablement préparée avec au moins 1,5 mL d'eau mQ stérile
- Ajuster la concentration de cellules à une DO_{600} comprise entre 0,8 et 1 (colorimètre : WPA colourwave CO7500)
- Déposer 3 gouttes de 5 µL sur le milieu gélosé choisi (CAS et/ou TCP) de façon à ce que les gouttes soient bien espacées (attention aux micros éclaboussures)
- Incuber à 25°C
- Faire des mesures à 4, 7, 11 et 14 jours des colonies d'une part, et du « halo + colonies » d'autre part à l'aide du pied à coulisse électronique (JLC)
- Pour avoir la mesure du halo, soustraire la mesure des colonies à la mesure « halo + colonies »
- Standardiser les mesures en % par rapport au témoin choisi (ex : PML1(12))

PROTOCOLE N°2 : TEST EN MICROPLAQUE ALTERATION DE LA BIOTITE

- Sortir des souches à raison de 10 par microplaques sur TSA 10% plus les témoins (positif PML1(12) et négatif PN3(3)) et incuber 2j à 25°C (NB : prévoir un peu plus de souches au cas où il y en aurait qui pousseraient mal voir pas du tout !)
- Passer les souches en culture liquide LB (10ml) et incuber 2 jours à 25°C sous agitation
- Récupérer les souches et mettre 2ml de culture dans des tubes Eppendorf de 2ml à raison de 2 tubes par souches
- Centrifuger 10min à 11000 rpm à 6°C
- Jeter le surnageant et laver avec 2ml d'eau mQ stérile
- Centrifuger 10min à 11000 rpm à 6°C
- Répéter le lavage 3 fois en tout
- Resuspendre le culot dans la dernière goutte
- Ajuster la DO de chaque souche entre 0,8 et 1 à 600nm dans des tubes à hémolyse contenant 2ml d'eau mQ stérile
- En parallèle, préparer du milieu BHm 1X + glc (5ml BHm 10X + 5ml glucose 20g/L + QSP avec eau mQ stérile à 50ml et filtrer à 0,22 µm) et stériliser aux UV des microplaques (noter la référence du lot ici : Août 2007) contenant de la biotite (2 séries de 30min sous la PSM)
- Remplir des microplaques contenant de la biotite (±10mg) avec 180 µl de milieu BHm 1X + glucose
- Ajouter 20 µl de culture à DO comprise entre 0,8 et 1 dans les puits à raison d'une souche par colonne (de préférence mettre les témoins dans les colonnes 11 (+) et 12 (-), et surtout bien agiter avant chaque dépôt)
- Recouvrir la microplaque d'une feuille de scotch avant de remettre le couvercle (NB : ne pas appuyer sur le couvercle pour ne pas faire sortir le liquide !) (Ref. Nunc :236366, Ref. Dutscher : 055049)
- Mettre les microplaques à incuber à 25°C sous agitation (350 rpm) pendant 48h
- Au bout de 48h, préparer des microplaques de révélation avec une solution de bromocrésol à 1g/L et du ferrospectral : prendre une boîte de pétri, en veillant à ce qu'il n'y est pas de poussière, et mettre le bromocrésol dans la grande partie et le ferrospectral dans le couvercle de la boîte et remplir les microplaques à l'aide d'un pipetman multicanal comme suit : les 4 premiers puits de chaque colonne avec du bromocrésol et les quatre suivants avec du ferrospectral (cf figure) (NB : la révélation doit se faire rapidement !) (//\ A manipuler avec Gants + lunettes + masque //\)



- Récupérer les microplaques contenant les souches et vérifier qu'il n'y a AUCUN grain de biotite coincée en dessous
- Peser ces microplaques, elles ne doivent pas avoir un écart de poids de plus de 0,5g entre elles
- Poser (avec un petit « clic ») les microplaques avec la biotite sur les microplaques contenant le bromocrésol et le ferrospectral (NB : faire un signe distinctif sur les deux plaques mises l'une sur l'autre afin d'éviter les permutations de plaques)
- Centrifuger les microplaques ainsi disposées à l'aide du rotor S2096 pendant 10min à 3000rpm à 6°C (NB : les écritures présentes sur les étriers doivent être positionnées vers l'extérieur)
- Séparer les microplaques (une à la fois pour éviter les permutations)
- Enlever le scotch de la première microplaque doucement et d'un mouvement continu afin d'éviter les projections (NB : de préférence commencer par enlever du côté des témoins) (autoclaver le scotch)
- Prendre un cône et gratouiller chaque puits doucement (1 cône pour une colonne = 8 puits) en veillant à ne pas abîmer le filtre
- Replacer les microplaques l'une sur l'autre en veillant à bien remettre chaque microplaque avec sa « jumelle »
- Centrifuger 10min à 3000rpm à 6°C
- Allumer l'ordinateur et le spectrophotomètre Biorad
- Placer la microplaque sans le couvercle dans le spectrophotomètre (en veillant à ce qu'il n'y est aucune poussière ou autre qui tombe dedans)
- Lire la microplaque à une DO de 595nm et en veillant à activer l'option "shake" pour homogénéiser les solutions.
- Transformation des données : $Fe = 5,6422 * DO_{595} - 0,1795$
 $pH = 0,8508 * LN(DO_{595}) + 5,2763$
- Gestion des déchets :
 - Plaque biotite => autoclave, sauf si observation microscope
 - Plaque de révélation => séchage sous hotte

PROTOCOLE N°3 : DE DOSAGE DES OXYDE-HYDROXYDES DE FER APRES UN BIOTEST EN MICROPLAQUE

- Préparer une solution de KCL/hydroxylamine : KCL 1M + NH₂OH 0.2% à pH 5.
(NB : cette solution peut être préparée à l'avance et stockée à T° ambiante)
- Remplir la microplaque avec 200µl de solution
- Incuber à 25°C à 350rpm pendant une heure
- Préparer une autre microplaque (sans filtre) dans laquelle on met 20µl de ferrospectral
- Récupérer la première microplaque que l'on place au-dessus de celle contenant le ferrospectral
- Centrifuger le tout à 3000rpm pendant 10min à 6°C
- Séparer les microplaques
- Prendre un cône et gratouiller chaque puits doucement en veillant à ne pas abîmer le filtre, ceci afin d'éviter le colmatage des filtres par la biotite
- Remettre les microplaques l'une sur l'autre en faisant bien attention de les remettre dans le même sens
- Répéter l'étape de centrifugation
- Lire la microplaque contenant le ferrospectral à l'aide d'un spectrophotomètre (λ: 595nm). (NB: ne pas hésiter à faire "mélanger" la plaque avant la lecture, la plupart des spectrophotomètre de microplaque disposent de cette option)
- Transformer les données obtenues à l'aide de la formule : $\text{Fer} = 5,6422 \cdot X - 0,1795$ (X étant la valeur obtenue par lecture au spectrophotomètre)
- Interpréter les résultats

PROTOCOLE N°4 : EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE

- Faire une culture de la souche dont l'ADN est à extraire
- Mettre 30ml de culture dans un Falcon 50ml
- Centrifuger pdt 15min à 5000rpm
- Reprendre le culot dans 20ml de TE
- Centrifuger 15 min à 5000rpm
- Evacuer le surnageant
- QSP avec TE à 5ml + 50 µl NaCl 5M + 50µl Lysozyme
- Incubation 1h à 37° + venir agiter de tps en tps
- Ajouter 500µl SDS 10% + 20µl protéinase K
- Incubation 2h à 55°C en venant agiter de tps en tps
- Ajout 1/3 volume de NaCl 5M + 1 volume de chloroforme
- Incubation 50 min à T° ambiante en agitant de tps en tps
- Centrifuger 4500G pdt 15min
- Transférer la phase aqueuse dans un Falcon de 15ml (+ phase blanche dans un deuxième = ADN "sale")
- Ajout 1volume d'isopropanol et inverser doucement le tube afin de précipiter l'ADN
- Transférer dans tubes eppendorf de 2ml si besoin faire QSP avec isopropanol
- Centrifuger 15min à 13000rpm à 6°C
- Evacuer surnageant
- Faire deux lavages à l'éthanol 70% => ajouter 500µl d'éthanol et centrifuger 13000rpm pdt 10min
- Faire sécher les tubes (attention à ne pas perdre les culots)
- Resuspendre dans du tampon TE (ou de l'eau mQ) et tout transférer dans un seul tube de façon à avoir entre 100 et 200 µl d'ADN

PROTOCOLE N°5 : LIGATION

- Pour 20 µl de réaction :
 - 1/10 buffer T4 10X
 - 10µl d'insert
 - 7µl de vecteur
 - 1µl de ligase
- Incuber à la paillasse sur la nuit

PROTOCOLE N°6 : TRANSFORMATION

- Sortir les cellules compétentes (protocole n°7) sur glace pendant 10 min
- Ajouter 2 à 10 μ l d'ADN à transformer (ex: ligation)
- Laisser incubé 30min sur glace
- Faire un choc thermique pendant 30 à 45 secondes à 42°C
- Remettre aussitôt 30 à 45 secondes dans la glace
- Ajouter 200 μ l de milieu LB
- Incuber 1h à 37°C (le temps d'incubation et la température peut varier selon la souche et l'ADN à transformer)
- Étaler sur 3 boîtes contenant le milieu adéquat (antibiotique, X-gal, source de carbone, etc) afin de sélectionner les clones ayant intégré l'ADN.
- Incuber le temps nécessaire à température optimale (ex: pour une transformation avec une souche d'*Escherichia coli* : incuber sur la nuit à 37°C.)

PROTOCOLE N°7 : PREPARATION DE CELULES COMPETENTES

- Strier des cellules d'un stock congelé sur une boîte de LBm et faire pousser une nuit à 37°C (jour 1)
- Ensemencer dans 5 mL de LBm et mettre à agiter une journée à 37°C (jour 2)
- Ensemencer 50 µL de préculture stationnaire dans 100 mL de SOB dans un erlen de 1 L (jour 3). Faire pousser à 18-20°C avec agitation forte (200-250 rpm).
- Arrêter à une DO de 0,6 (jour5) en plaçant l'erlen dans la glace pendant 10 min.
- Transférer dans des falcon 50 mL et centrifuger 10 min à 3000 rpm
- Reprendre le culot dans 32 mL de TB froid
- Incuber 10 min dans la glace
- Centrifuger 10 min à 4°C à 3000 rpm
- Reprendre doucement dans 8 mL de TB et ajouter 602 µL de DMSO (à une concentration finale de 7%) en mélangeant doucement.
- Incuber 10 min dans la glace puis répartir dans des tubes eppendorf (100 µL par tube) et congeler immédiatement à - 80°C.

➤ SOB :

Pour 1 L :

- 20 g Bactotryptone
- 5 g Extrait de levure
- 0,5 g NaCl
- 0,2 g KCl

➤ TB :

Pour 500 mL

- 1,19 g Pipes (ou Hepes)
- 1,10 g CaCl₂
- 9,32 g KCl

QSP à 500 mL avec de l'eau mQ, ajuster le pH à 6,7 avec du KOH puis ajouter 5,44 g de MnCl₂

La solution est filtrée à 0,22 µm.

PROTOCOLE N°12 : PRECIPITATION/PURIFICATION D'ADN

- Pour 50µl d'ADN à précipiter.
- Ajouter 5µl de NaCl à 5M
- 2 volume d'éthanol absolu **froid**
- Inverser doucement le tube
- Incuber au moins 20 à 30min à -20°C
- Centrifuger à 13000rpm à 4°C pendant 30min
- Evacuer le surnageant
- Ajouter 100µl d'éthanol à 70% **froid**
- Centrifuger à 13000rpm à 4°C pendant 15min
- Refaire un lavage à l'éthanol 70% **froid**
- Faire sécher le tube
- Resuspendre le culot dans 50µl d'eau mQ ou de tampon TE.

PROTOCOLE N°13 : MISE EN COLLECTION DE BACTERIES

- Récupérer les échantillons bruts (racines, sol, mycorhizes, minéraux, etc) dans des tubes stériles préalablement notés et pesés.
- Peser les tubes avec les échantillons pour déterminer la masse fraîche.
- Ajouter 5ml d'eau stérile
- Vortexer pendant 1min.
 - Faire un aliquot de 1ml pour stocker à -80°C avec du glycérol (minimum 20%)
 - Prendre 300µl pour faire des dilutions en séries (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) dans des tubes préalablement préparés (avec 2700µl d'eau stérile)
 - Faire sécher le reste et ensuite peser pour obtenir la masse sèche (! prendre en compte les 1,35ml utilisés)
- Etaler 50µl par dilutions sur TSA 10% et TSA 10% + Cycloheximide (3 répétitions par dilution)

PROTOCOLE N°15 : EXTRACTION DE PLASMIDE AVEC LE KIT QIAGEN

Protocol: Plasmid DNA Purification Using the QIAprep Spin Miniprep Kit and a Microcentrifuge

This protocol is designed for purification of up to 20 µg of high-copy plasmid DNA from 1–5 ml overnight cultures of *E. coli* in LB (Luria-Bertani) medium. For purification of low-copy plasmids and cosmids, large plasmids (>10 kb), and DNA prepared using other methods, refer to the recommendations on page 44.

Please read “Important Notes” on pages 15–21 before starting.

Note: All protocol steps should be carried out at room temperature.

Procedure

- 1. Resuspend pelleted bacterial cells in 250 µl Buffer P1 and transfer to a microcentrifuge tube.**

Ensure that RNase A has been added to Buffer P1. No cell clumps should be visible after resuspension of the pellet.

If LyseBlue reagent has been added to Buffer P1, vigorously shake the buffer bottle to ensure LyseBlue particles are completely dissolved. The bacteria should be resuspended completely by vortexing or pipetting up and down until no cell clumps remain.

- 2. Add 250 µl Buffer P2 and mix thoroughly by inverting the tube 4–6 times.**

Mix gently by inverting the tube. Do not vortex, as this will result in shearing of genomic DNA. If necessary, continue inverting the tube until the solution becomes viscous and slightly clear. Do not allow the lysis reaction to proceed for more than 5 min.

If LyseBlue has been added to Buffer P1 the cell suspension will turn blue after addition of Buffer P2. Mixing should result in a homogeneously colored suspension. If the suspension contains localized colorless regions or if brownish cell clumps are still visible, continue mixing the solution until a homogeneously colored suspension is achieved.

- 3. Add 350 µl Buffer N3 and mix immediately and thoroughly by inverting the tube 4–6 times.**

To avoid localized precipitation, mix the solution thoroughly, immediately after addition of Buffer N3. Large culture volumes (e.g. ≥5 ml) may require inverting up to 10 times. The solution should become cloudy.

If LyseBlue reagent has been used, the suspension should be mixed until all trace of blue has gone and the suspension is colorless. A homogeneous colorless suspension indicates that the SDS has been effectively precipitated.

- 4. Centrifuge for 10 min at 13,000 rpm (~17,900 x g) in a table-top microcentrifuge.**

A compact white pellet will form.

5. Apply the supernatants from step 4 to the QIAprep spin column by decanting or pipetting.
6. Centrifuge for 30–60 s. Discard the flow-through.
7. Recommended: Wash the QIAprep spin column by adding 0.5 ml Buffer PB and centrifuging for 30–60 s. Discard the flow-through.

This step is necessary to remove trace nuclease activity when using *endA*⁺ strains such as the JM series, HB101 and its derivatives, or any wild-type strain, which have high levels of nuclease activity or high carbohydrate content. Host strains such as XL-1 Blue and DH5 α [™] do not require this additional wash step.

8. Wash QIAprep spin column by adding 0.75 ml Buffer PE and centrifuging for 30–60 s.
9. Discard the flow-through, and centrifuge for an additional 1 min to remove residual wash buffer.
Important: Residual wash buffer will not be completely removed unless the flow-through is discarded before this additional centrifugation. Residual ethanol from Buffer PE may inhibit subsequent enzymatic reactions.
10. Place the QIAprep column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube. To elute DNA, add 50 μ l Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) or water to the center of each QIAprep spin column, let stand for 1 min, and centrifuge for 1 min.

Protocol: Plasmid DNA Purification Using the QIAprep Spin Miniprep Kit and 5 ml Collection Tubes

The QIAprep Spin Miniprep procedure can be performed using 5 ml centrifuge tubes (e.g., Greiner, cat. no. 115101 or 115261) as collection tubes to decrease handling. The standard protocol on pages 22–23 should be followed with the following modifications:

- Step 4:** Place a QIAprep spin column in a 5 ml centrifuge tube instead of a 2 ml collection tube.
- Step 6:** Centrifuge at 3000 \times *g* for 1 min using a suitable rotor (e.g., Beckman® GS-6KR centrifuge at ~4000 rpm). (The flow-through does not need to be discarded.)
- Steps 7 and 8:** For washing steps, centrifugation should be performed at 3000 \times *g* for 1 min. (The flow-through does not need to be discarded.)
- Step 9:** Transfer the QIAprep spin column to a microcentrifuge tube. Centrifuge at maximum speed for 1 min. Continue with step 10 of the protocol.

PROTOCOLE N°16 : MICROPLAQUES BIOLOG® ECOPLATES

EcoPlate™

A1 Water	A2 β-Methyl-D-Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl-D-Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl-D-Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine
B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D-Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D-Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D-Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine
C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L-Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L-Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L-Phenylalanine
D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine
E1 α-Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D-Glucosamine	E3 γ-Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α-Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D-Glucosamine	E3 γ-Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α-Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D-Glucosamine	E3 γ-Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine
F1 Glycogen	F2 D-Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L-Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D-Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L-Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D-Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L-Glutamic Acid
G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethylamine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethylamine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethylamine
H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α-Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α-Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α-Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine

FIGURE 1. Carbon Sources in EcoPlate

INTRODUCTION

Microbial communities provide useful information about environmental change. Microorganisms are present in virtually all environments and are typically the first organisms to react to chemical and physical changes in the environment. Because they are near the bottom of the food chain, changes in microbial communities are often a precursor to changes in the health and viability of the environment as a whole.

The Biolog EcoPlate™ (Figure 1) was created specifically for community analysis and microbial ecological studies. It was originally designed at the request of a group of microbial ecologists that had been using the Biolog GN MicroPlate™, but wanted a panel that provided replicate sets of tests¹.

Community analysis using the Biolog MicroPlates was originally described in 1991 by J. Garland and A. Mills². Researchers found that by inoculating Biolog GN MicroPlates with a mixed culture of microorganisms and measuring the community fingerprint over time, they could ascertain characteristics about that community of microbes. This approach, called community-level physiological profiling, has been demonstrated to be effective at distinguishing spatial and

temporal changes in microbial communities. In applied ecological research, the MicroPlates are used as both an assay of the stability of a normal population and to detect and assess changes following the onset of an environmental variable.

Studies have been done in diverse applications of microbial ecology and have demonstrated the fundamental utility of Biolog MicroPlates in detecting population changes in soil, water, wastewater, activated sludge, compost, and industrial waste. The utility of the information has been documented in over 500 publications using Biolog technology to analyze microbial communities. A bibliography of publications is posted on the Biolog website at www.biolog.com/mID_section_4.html.

ECOPLATE

The Biolog EcoPlate contains 31 of the most useful carbon sources for soil community analysis. These 31 carbon sources are repeated 3 times to give the scientist more replicates of the data. Communities of organisms will give a characteristic reaction pattern called a metabolic fingerprint. These fingerprint reaction patterns rapidly and easily provide a vast amount of information from a single Biolog MicroPlate.

The community reaction patterns are typically analyzed at defined time intervals over 2 to 5 days. The changes in the pattern are compared and analyzed using statistical analysis software. The most popular method of analysis of the data is via Principle Components Analysis (PCA) of average well color development (AWCD) data, but alternative methods may also offer advantages³⁻⁸. The changes observed in the fingerprint pattern provide useful data about the microbial population changes over time.

Biolog MicroPlates have been compared to other methods, such as phospholipid fatty-acid analysis, for monitoring community and ecological changes. The MicroPlates were found to be more sensitive to changes in the environment⁹. Biolog MicroPlates were also indicated as more sensitive to changes in major determinants such as temperature and water.

Similar analyses have been performed using the Biolog GN and GN2 MicroPlates. For certain applications the GN2 MicroPlates may be preferable to the EcoPlate. The individual application will dictate which MicroPlate is best suited for the community or ecological analysis.

TYPICAL PROCEDURE³

STEP 1: Environmental samples are inoculated directly into Biolog MicroPlates either as aqueous samples or after suspension (soil, sludge, sediment, etc...).

STEP 2: The Biolog MicroPlates are incubated and analyzed at defined time intervals.

STEP 3: The community-level physiological profile is assessed for key characteristics:

- Pattern development (similarity)
- Rate of color change in each well
- Richness of well response (diversity)

Formation of purple color occurs when the microbes can utilize the carbon source and begin to respire. The respiration of the cells in the community reduces a tetrazolium dye that is included with the carbon source.

The reaction patterns are most effectively analyzed with a microplate reader, using the MicroStation System. However, any good microplate reader can be used to provide optical density (OD₅₉₀) values.

Statistical analysis of the data is typically performed using standard software packages. Some researchers have found that PCA provides greater resolution than other methods of statistical analysis¹⁰.

REFERENCES

- [1] A new set of substrates proposed for community characterization in environmental samples. H. Insam, p. 260-261, In: Microbial Communities. Functional versus structural approaches, H. Insam and A. Rangger, editors, 1997, Springer.
- [2] Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole-carbon-source utilization. J.L. Garland, A.L. Mills, Applied and Environmental Microbiology, 1991, v.57, p. 2351-2359.
- [3] Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. J.L. Garland, Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Ecology, 1997, v. 24, p289-300.
- [4] Community analysis by Biolog: curve integration for statistical analysis of activated sludge microbial habitats, J.B. Guckert, G.J. Carr, T.D. Johnson, B.G. Hamm, D.H. Davidson, Y. Kumagai, Journal of Microbiological Methods, 1996, v. 27:2-3, p. 183-187.
- [5] Statistical analysis of the time-course of Biolog substrate utilization. C.A. Hackett, B.S. Griffiths, Journal of Microbiological Methods, 1997, v. 30, p. 63-69.
- [6] Statistical comparisons of community catabolic profiles. E. Glimm, H. Heuer, B. Engelen, K. Smalla, H. Backhaus, Journal of Microbiological Methods, 1997, v. 30, p. 71-80.
- [7] Application of multivariate analysis of variance and related techniques in soil studies with substrate utilization tests, W. Hitzl, M. Henrich, M. Kessel, and H. Insam, Journal of Microbiological Methods, 1997, v. 30, p. 81-89.
- [8] Using the Gini coefficient with BIOLOG substrate utilization data to provide an alternative quantitative measure for comparing bacterial soil communities, B.D. Harch, R.L. Correll, W. Meech, C.A. Kirkby, and C.E. Pankhurst, Journal of Microbiological Methods, 1997, v. 30, p. 91-101.
- [9] Defining soil quality in terms of microbial community structure. M. Firestone, T. Balsler, D. Herman, Annual Reports of Research Projects, UC Berkeley, 1998.
- [10] Defining soil quality in terms of microbial community structure. M. Firestone, T. Balsler, D. Herman, Annual Reports of Research Projects, UC Berkeley, 1997

PROCOLE N°17 : MICROPLAQUES BIOLOG® GENIII

GEN III MicroPlate™

Instructions for Use

Not for human in vitro diagnostic use



21124 Cabot Blvd.

Hayward, CA 94545

TEL 510-785-2564, FAX 510-782-4639

ORDERS 1-800-284-4949

www.biolog.com

© copyright, Biolog, Inc.

Part# 00P 185, Rev A MAR 2008

INSTRUCTIONS FOR USE OF THE BIOLOG GEN III MICROPLATE™

Intended Use

The GEN III MicroPlate™ test panel provides a standardized micromethod using 94 biochemical tests to profile and identify a broad range of Gram-negative and Gram-positive bacteria^{1,2}. Biolog's Microbial Identification Systems software (e.g. OmniLog® Data Collection) is used to identify the bacterium from its phenotypic pattern in the GEN III MicroPlate.

Description

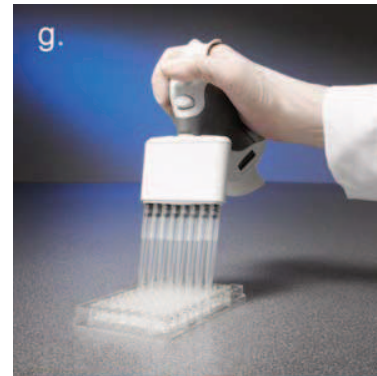
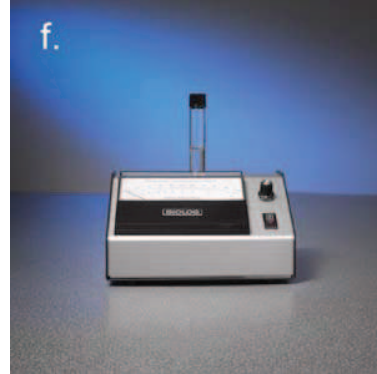
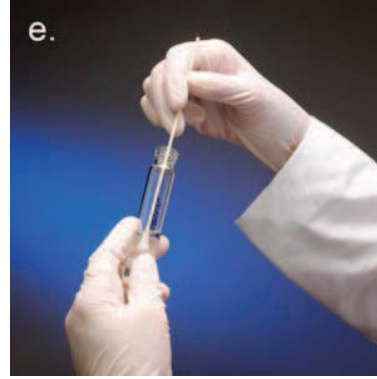
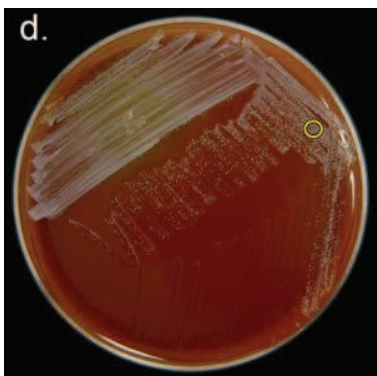
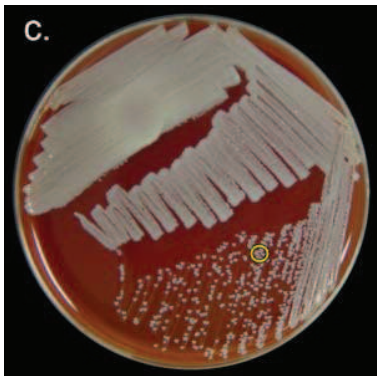
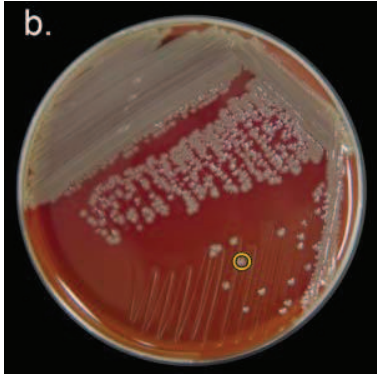
- The Biolog GEN III MicroPlate analyzes a microorganism in 94 phenotypic tests: 71 carbon source utilization assays (**Figure 1, columns 1-9**) and 23 chemical sensitivity assays (**Figure 1, columns 10-12**). The test panel provides a “**Phenotypic Fingerprint**” of the microorganism that can be used to identify it at the species level.
- All necessary nutrients and biochemicals are pre-filled and dried into the 96 wells of the MicroPlate. Tetrazolium redox dyes are used to colorimetrically indicate utilization of the carbon sources or resistance to inhibitory chemicals.
- Testing is performed very simply, as shown in **Figure 2**. The isolate to be identified is grown on agar medium and then suspended in a special “gelling” inoculating fluid³ (IF) at the recommended cell density. Then the cell suspension is inoculated into the GEN III MicroPlate, 100 µl per well, and the MicroPlate is incubated to allow the phenotypic fingerprint to form. All of the wells start out colorless when inoculated. During incubation there is increased respiration in the wells where cells can utilize a carbon source and/or grow. Increased respiration causes reduction of the tetrazolium redox dye, forming a purple color. Negative wells remain colorless, as does the negative control well (A-1) with no carbon source. There is also a positive control well (A-10) used as a reference for the chemical sensitivity assays in columns 10-12. After incubation, the phenotypic fingerprint of purple wells is compared to Biolog's extensive species library. If a match is found, a species level identification of the isolate is made.

Figure 1. Layout of assays in the MicroPlate

GEN III MicroPlate™

A1 Negative Control	A2 Dextrin	A3 D-Maltose	A4 D-Trehalose	A5 D-Cellobiose	A6 Gentiobiose	A7 Sucrose	A8 D-Turanose	A9 Stachyose	A10 Positive Control	A11 pH 6	A12 pH 5
B1 D-Raffinose	B2 α-D-Lactose	B3 D-Melibiose	B4 β-Methyl-D-Glucoside	B5 D-Salicin	B6 N-Acetyl-D-Glucosamine	B7 N-Acetyl-β-D-Mannosamine	B8 N-Acetyl-D-Galactosamine	B9 N-Acetyl Neuraminic Acid	B10 1% NaCl	B11 4% NaCl	B12 8% NaCl
C1 α-D-Glucose	C2 D-Mannose	C3 D-Fructose	C4 D-Galactose	C5 3-Methyl Glucose	C6 D-Fucose	C7 L-Fucose	C8 L-Rhamnose	C9 Inosine	C10 1% Sodium Lactate	C11 Fusidic Acid	C12 D-Serine
D1 D-Sorbitol	D2 D-Mannitol	D3 D-Arabitol	D4 myo-Inositol	D5 Glycerol	D6 D-Glucose-6-PO4	D7 D-Fructose-6-PO4	D8 D-Aspartic Acid	D9 D-Serine	D10 Troleandomycin	D11 Rifamycin SV	D12 Minocycline
E1 Gelatin	E2 Glycyl-L-Proline	E3 L-Alanine	E4 L-Arginine	E5 L-Aspartic Acid	E6 L-Glutamic Acid	E7 L-Histidine	E8 L-Pyroglutamic Acid	E9 L-Serine	E10 Lincomycin	E11 Guanidine HCl	E12 Niaproof 4
F1 Pectin	F2 D-Galacturonic Acid	F3 L-Galactonic Acid Lactone	F4 D-Gluconic Acid	F5 D-Glucuronic Acid	F6 Glucuronamide	F7 Mucic Acid	F8 Quinic Acid	F9 D-Saccharic Acid	F10 Vancomycin	F11 Tetrazolium Violet	F12 Tetrazolium Blue
G1 p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	G2 Methyl Pyruvate	G3 D-Lactic Acid Methyl Ester	G4 L-Lactic Acid	G5 Citric Acid	G6 α-Keto-Glutaric Acid	G7 D-Malic Acid	G8 L-Malic Acid	G9 Bromo-Succinic Acid	G10 Nalidixic Acid	G11 Lithium Chloride	G12 Potassium Tellurite
H1 Tween 40	H2 γ-Amino-Butyric Acid	H3 α-Hydroxy-Butyric Acid	H4 β-Hydroxy-D,L-Butyric Acid	H5 α-Keto-Butyric Acid	H6 Acetoacetic Acid	H7 Propionic Acid	H8 Acetic Acid	H9 Formic Acid	H10 Aztreonam	H11 Sodium Butyrate	H12 Sodium Bromate

Figure 2. Steps in the testing protocol



Materials Provided

- **MicroPlates:** Catalog No.1030- Biolog GEN III MicroPlates (10/box).
- **On receipt, inspect** foil pouches and MicroPlates for damage in shipping. To maintain the full shelf life, the foil pouched MicroPlates must be **stored at 2-8° C**. **The expiration date** is printed on each pouch. Do not use the MicroPlates after the expiration date.

Materials Not Provided

- **Agar Culture Media:** Catalog No.71102-BUG Agar with 5% sheep blood (**BUG+B**); Catalog No. Bio-M1012- **Chocolate Agar**; Catalog No.70101- Biolog Dehydrated Growth Agar, 500 gm (**BUG Agar**).
- **Inoculating Fluid:** Catalog No.72401- **IF-A**, Catalog No.72402- **IF-B**, Catalog No. 72403- **IF-C**.
- **Inoculatorz™:** Catalog No.3321- Sterile disposable inoculator swabs (20x50); Catalog No.3323 (100x1).
- **Streakerz™:** Catalog No.3025- Sterile disposable wooden agar plate streakers (10x100); Catalog No.3026 (50x20).
- **Transfer Pipets:** Catalog No.3019- Sterile disposable 9 inch transfer pipets.
- **Reservoirs:** Catalog No.3102- Sterile disposable reservoirs.
- **Multichannel Pipettes:** Catalog No.3711- 8 channel electronic pipettor.
- **Pipet Tips:** Catalog No. 3201- Sterile racked pipet tips for Ovation multichannel pipettor; Catalog No. 3001- Matrix multichannel pipettor tips.
- **Turbidimeter:** Catalog No.3531- 110 volt model, Catalog No.3532 -220 volt model, Catalog No.3585 - 240 volt model.
- **Turbidity Standards:** Catalog No.3441 - 85% T; Catalog No.3440 - 65% T.

Determine Appropriate Protocol to Use (Inoculating Fluid and Cell Density)

- All protocols are performed in the same manner, the only difference being the choice of inoculating fluid (IF) and cell density for inoculation.
- **Protocol A** is used for the vast majority of species.
- **Protocol B** is used for a small number of strongly reducing species and capsulated species (primarily some strains of *Aeromonas*, *Vibrio*, and spore-forming Gram-positive rods). These species will give a false-positive result in the A-1 well with Protocol A. If this occurs, simply repeat the test using Protocol B.
- **Protocol C1** is used for slow growing bacteria that typically form pinpoint-sized colonies (less than 1 mm in diameter) on BUG+B Agar in 24 hours of growth (see example in **Figure 2.d.**). These are primarily microaerophilic and capnophilic Gram-positive cocci and tiny rods. See Table 1. below for a list.
- **Protocol C2** is used for fastidious, capnophilic, and very oxygen-sensitive bacteria that grow very slowly or not at all on BUG+B Agar. For example, it is used for fastidious Gram-negative species that would most likely be encountered from respiratory tract specimens after cultivation on Chocolate Agar with 6.5% CO₂. Some very oxygen-sensitive Gram-positive bacteria also require the higher inoculation density of Protocol C2. See Table 1. below for a list.
- If unsure of the appropriate test protocol, use protocol A. If the result fails to yield an identification because of a false-positive A-1 well, then use Protocol B. If the result fails because of insufficient positive carbon source reactions, then try, in succession, Protocols C1 and C2.

Table 1. Test Protocols

Protocol	IF	Cell Density	Species
A	A	90-98% T	Nearly all – this is the default protocol
B	B	90-98% T	Strongly reducing and capsule producing GN (e.g., some <i>Aeromonas</i> , <i>Vibrio</i>) and GP (e.g., some <i>Bacillus</i> , <i>Aneurinibacillus</i> , <i>Brevibacillus</i> , <i>Lysinibacillus</i> , <i>Paenibacillus</i> , and <i>Virgibacillus</i>)
C1	C	90-98% T	Microaerophilic, capnophilic GP (e.g., <i>Dolosicoccus</i> , <i>Dolosigranulum</i> , <i>Eremococcus</i> , <i>Gemella</i> , <i>Globicatella</i> , <i>Helcococcus</i> , <i>Ignavigranum</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Weissella</i> , and some <i>Aerococcus</i> , <i>Arcanobacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> and <i>Enterococcus</i> sp.)
C2	C	62-68% T	Fastidious, capnophilic, oxygen sensitive GN (e.g., <i>Actinobacillus</i> , <i>Aggregatibacter</i> , <i>Alysiella</i> , <i>Avibacterium</i> , <i>Bergeriella</i> , <i>Bordetella</i> , <i>Capnocytophaga</i> , <i>Cardiobacterium</i> , <i>CDC Group DF-3</i> , <i>CDC Group EF-4</i> , <i>Conchiformibius</i> , <i>Dysgonomonas</i> , <i>Eikenella</i> , <i>Francisella</i> , <i>Gallibacterium</i> , <i>Gardnerella</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Histophilus</i> , <i>Kingella</i> , <i>Methylobacterium</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Oligella</i> , <i>Ornithobacterium</i> , <i>Pasteurella</i> , <i>Simonsiella</i> , <i>Suttonella</i> , and <i>Taylorella</i>) and GP (<i>Actinomyces</i> , <i>Aerococcus</i> , <i>Alloiococcus</i> , <i>Arcanobacterium</i> , <i>Carnobacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Erysipelothrix</i> , <i>Granulicatella</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , and <i>Tetragenococcus</i>)

TEST PROCEDURE

Preparation

- Before starting, prewarm MicroPlates and IF to room temperature and review the entire protocol, including precautions.

Step 1. Culture Organism on Biolog Recommended Agar Media

- **Isolate a pure culture** on Biolog recommended agar media (**BUG+B** or **Chocolate Agar**) and incubate at 33° C. Some species may require special culture conditions, for example either lower or higher temperature (26° - 37° C.) and elevated CO₂ (6.5% - 10%).
- **Use of alternative media should be validated.** For laboratories that need to use agar media without blood, we recommend using **BUG Agar**. However, some species will grow extremely slowly or not at all if blood is omitted, for example the genera listed for Protocols C1 and C2 in Table 1. **R2A Agar** and Tryptic Soy Agar without or with blood (**TSA, TSA+B**) can be substituted, but they will not culture as wide a range of bacteria as BUG+B. Furthermore, their recipes and performance characteristics from different vendors may vary.
- **The cells must be freshly grown** since many strains lose viability and metabolic vigor in stationary phase. The recommended incubation period for most organisms is 4-24 hours. Spore-forming gram-positive bacteria (*Bacillus* and related genera) should be grown for less than 16 hours to help minimize sporulation.
- **If insufficient growth is obtained** to inoculate the panel, restreak heavily (as a lawn) onto one or more agar plates. Incubate for 4-48 hours. This should give enough growth to inoculate the panel.

Step 2. Prepare Inoculum

- **Check the calibration of the turbidimeter** periodically. Use an appropriate turbidity standard (85% T or 65% T) and follow instructions in the turbidimeter manual to verify that the turbidimeter is calibrated and operating properly.
- **Blank the turbidimeter** with a clean tube (wiped clean of dirt and fingerprints) containing uninoculated IF. Because the tubes used are not optically uniform, they should be blanked individually. Set the 100% transmittance adjustment knob so that the meter reads 100%.
- **Prepare the inoculum at the desired turbidity.** The target cell density should be in the range of **90-98%T for Protocols A, B, and C1. Protocol C2 requires a higher cell density of 62-68%T** for species that are sensitive to oxygen. **Use a cotton-tipped inoculatorz swab** to pick up a 3 mm diameter area of cell growth from the surface of the agar plate. As shown in **Figure 2.a.**, grasp the swab at its tip and, holding the swab vertically, touch it to the cell growth. **Figure 2.b., c., and d.** show examples of fast, medium, and slow growing bacteria, and the yellow circle indicates where to touch the end of the cotton swab. For fast growing bacteria, touch a single colony, for medium growing bacteria, touch a cluster of colonies, and for slow growing bacteria touch the first area of confluent growth. Release the bacteria into the IF by rubbing the swab tip against the bottom of the tube containing IF as shown in **Figure 2.e.** Crush any cell clumps against the tube wall or remove them from the IF by catching them on the swab. Stir the IF with the swab to obtain a uniform cell suspension and read it in the turbidimeter, as shown in **Figure 2.f.** If the cell density is too low, add more cells. If the cell density is too high, add more IF.

For extremely clumpy bacteria that cannot be dispersed directly, use the following procedure. First prepare a dense suspension in 2 ml of IF as follows. **Use a sterile wooden Streakerz stick** to remove a clump of cell mass from the agar surface without gouging the agar. If the bacteria are extremely dry and embedded in the agar, use the edge of a **sterile glass microscope slide** to gently scrape a mass of cells onto the glass slide, again, without gouging the agar. The cells can then be scraped off the glass slide with a sterile Streakerz stick. Then use the Streakerz stick to deposit the cell mass onto the inner wall of a **dry tube**. Use the Streakerz stick to crush, break up, and spread the clumps of cells against and along the inner wall of the tube. Then add 2 ml of IF, and gradually slide the dispersed cells into the IF. The resulting cell suspension will be a mixture of suspended cells and residual clumps. Stand the tube in a rack for about 5 minutes and allow the clumps to settle to the bottom. Use a small pipet and transfer the suspended cells at the top into a fresh tube of IF to achieve the target cell density.

Step 3. Inoculate MicroPlate

- **Pour** the cell suspension into the multichannel pipet reservoir.
- **Fasten** 8 sterile tips securely onto the 8-Channel Repeating Pipettor and fill the tips by drawing up the cell suspension from the reservoir.
- **Fill all wells with precisely 100 µl** as shown in **Figure 2.g**. Be careful not to carry over chemicals or splash from one well into another. The inoculating fluid will form a soft gel shortly after inoculation.
- **Cover the MicroPlate** with its lid and eject the pipettor tips.

Step 4. Incubate MicroPlate

- **Place the MicroPlate** into the OmniLog incubator/reader as shown in **Figure 2.h.**, or into an incubator, for 3 to 36 hours. Incubate at 33° C., or use incubation conditions that were found to be optimal for the bacterium in Step 1.

RESULTS

Reading and Interpretation of Results

- **Read MicroPlates** using Biolog's Microbial Identification Systems software (e.g. OmniLog[®] Data Collection). Refer to the User Guide for instructions.
- **Biolog's Microbial Identification Systems Software performs all reading and interpretation of results.**
- The color densities in wells of the **carbon source utilization assays** in columns 1-9 are **referenced against the negative control well, A-1**. All wells visually resembling the A-1 well should be scored as "negative" (-) and all wells with a noticeable purple color (greater than well A-1) should be scored as "positive" (+). Wells with extremely faint color, or with small purple flecks or clumps are best scored as "borderline" (∅). Most species give dark, clearly discernible "positive" reactions. However, it is normal for the "positive" reactions of certain genera to be light or faint purple.
- The color densities in wells of the **chemical sensitivity assays** in columns 10-12 are **referenced against the positive control well, A-10**. All wells showing significant sensitivity to the inhibitory chemical, with less than half the color of the A-10 well are considered "negative" (-) for growth. All other wells showing normal or near normal purple color (similar to well A-10) are considered "positive" (+). If there is uncertainty about the interpretation, it is best to score the well as "borderline" (∅).
- **"False positive" color** is defined as purple color forming in the negative control well (A-1) and in other "negative" wells. This is seen with only a few species such as from the genera ***Aeromonas*, *Vibrio*, and *Bacillus***. If such a result occurs, the cells are simply retested with Protocol B and IF-B.
- **See Biolog's Microbial Identification Systems software User Guide for further assistance in interpreting identification results.**

Precautions

To obtain accurate and reproducible results, **the recommendations below must be followed.**

- **Read** the "Instructions for Use" prior to using the GEN III MicroPlate and follow the procedures.
- **Pure cultures must be used** to obtain identifications. The system is not designed to identify individual bacterial strains from within mixed cultures. The most common problem in identification is that microbiologists are not aware that they have a mixed culture. Streaking for isolated colonies may not be sufficient because isolated colonies can arise from a clump of cells as well as a single cell. Bacteria have sticky surfaces and they tightly adhere to other bacteria. **This is particularly a problem with mucoid bacteria, fresh environmental isolates, and staphylococci.** First, examine cultures with care using a dissecting microscope or some colony magnifying lens, to make sure that only one colony morphology is present in the culture. **If no species identification is obtained, you may still have a mixed culture.** Restreak the cells onto a multi-chromogenic agar medium and let the original agar plate and the chromogenic agar plate sit at room temperature for 3 or 4 days. Examine both plates carefully, looking for the outgrowth of "bumps" or non-uniform growth in the areas of confluent growth. On the chromogenic agar plate, look for more than one color. If necessary, reisolate the colony types that are present and perform the identification assay a second time.

- **Culture media and repeated subculturing** may affect the results. Strains may produce different phenotypic patterns depending upon how they are cultured prior to inoculation.
- **Sterile** components and aseptic techniques must be used in set-up procedures. Contamination will affect results.
- **Disposable glassware** should be used to handle all cell suspensions and solutions. Glassware that has been washed may contain trace amounts of soap or detergent that will affect results.
- **Prewarm** the IF and the MicroPlates to room temperature before use. Some species (e.g., *Neisseria sp.*) are very sensitive to cold shocks.
- **Check the calibration** of your turbidimeter carefully and **always prepare your inoculum within the specified density range.**
- **Biolog's chemistry** contains components that are sensitive to temperature and light. Store the inoculating fluids in the dark with refrigeration. Brown or yellow wells in the GEN III MicroPlate indicate deterioration of the chemistry.
- **Always keep in mind** that you are testing the metabolic properties of **live cells**. Some species can lose their metabolic vigor when subjected to stresses (e.g., temperature, pH, and osmolarity) for even a few minutes. To get the best performance possible from these MicroPlates, be aware that the cells are alive and take care in how you handle them.

Trouble Shooting

If all wells in columns 1-9 are positive, make sure that:

- You are using a microorganism that is appropriate for the GEN III MicroPlate. If the bacterium is a strongly reducing or capsulated species causing false positive color in the A-1 well, repeat the test using Protocol B and IF-B.
- You are not carrying over any nutrients from the agar growth medium into the inoculating fluid.
- Your inoculum is free of all clumps.
- Your inoculum density is not excessive – check the calibration of your turbidimeter.
- The A-1 well is not under-filled. It is used as a reference well by Biolog's Microbial Identification Systems software.

If all wells in columns 1-9 are negative, make sure that:

- You are using a microorganism that is appropriate for the GEN III MicroPlate. Oligotrophic species or extremely slow growing or oxygen sensitive bacteria, for example, may give all negative wells.
- Your cells are freshly grown and you have used the recommended agar culture medium.
- Your incubation temperature and atmosphere are correct for the organism that is being tested.
- The inoculating fluid was stored correctly and was prewarmed prior to use.
- You are handling the cells with all disposable hardware (soap residues are toxic).
- Your inoculum density is sufficient – check the calibration of your turbidimeter.
- The A-1 well is not over-filled. It is used as a reference well by Biolog's Microbial Identification Systems software.

Performance Characteristics

The GEN III MicroPlate performance characteristics have been determined by establishing a database using a large collection of microorganisms from diverse sources. The database is designed to give identifications of all species in the database, in accordance with current standards of classical identification methods and current taxonomic nomenclature. **To obtain accurate and reproducible results, all procedures and recommendations in these Instructions for Use must be followed precisely.**

Limitations

The GEN III MicroPlate is designed to identify pure cultures of Gram-negative and Gram-positive bacteria. The panel will only identify members of the species in the current database. Other species will usually be reported out with the message "no identification." Atypical strains may also yield a low similarity index and therefore will be reported out as "no identification." **This product is not for human in vitro diagnostic use.** Some bacterial species are reportable to government and public health agencies in certain circumstances. For any isolate that is identified as *Salmonella* or *Shigella* or *E. coli O157:H7*, we recommend confirmation by serology. *Neisseria gonorrhoeae* identifications should also be confirmed. Appropriate caution and confirmation should be used for isolates suspected of being **Dangerous Pathogens.**

Quality Control

Biolog MicroPlates are tested and meet internal quality control standards before being released for sale. However, some laboratories may desire or may be required to perform independent quality control checks on each manufacturing lot.

To test the performance of the GEN III MicroPlate use the 2 Gram-negative and 2 Gram-positive strains specified below using Protocol A. These are available from Biolog as a set (Biolog Catalog No.8050).

1. <i>Escherichia coli</i>	ATCC 11775
2. <i>Paenibacillus polymyxa</i>	ATCC 842
3. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
4. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	ATCC 13637

Inoculate each bacterium following the TEST PROCEDURE as specified. When lyophilized or frozen cultures are used, they should be **subcultured at least twice** before being tested.

Read the panels after appropriate incubation. The resulting identification should correctly correspond to the identity of the quality control strain.

If the identification does not match, review the test procedures and check the purity of your culture. Repeat the test.

Technical Assistance

For help or to **report problems** with this product contact Biolog Technical Service either by phone (510-785-2564) by fax (510-782-4639) or by email (tech@biolog.com) during business hours (7:30 A.M. to 5 P.M. Pacific Standard Time), or contact the Biolog Distribution Partner in your area.

General information, Certificates of Analysis and MSDS can now be found at www.biolog.com.

References

- ¹ Bochner, BR 1989. Sleuthing out Bacterial Identities. *Nature* 339:157-158.
- ² Bochner, BR 1989. "Breathprints" at the Microbial Level. *ASM News* 55:536-539.
- ³ Biolog, Inc., US Patent # 5,627,045.

OmniLog®, MicroPlate™, Streakerz™, and Inoculatorz™ are trademarks of Biolog, Inc.

PROTOCOLE N°18 : TESTS ENZYMATIQUES

1. Objet et d` maine d`applicati`n

Les méthodes colorimétriques et fluorimétriques présentées ici permettent de déterminer, quantifier et comparer huit activités enzymatiques secrétées par des racines d'arbres ectomycorhizées : sept par fluorescence (glucuronidase, xylosidase, cellobiohydrolase, chitinase, beta-glucosidase, phosphatase acide et leucine-aminopeptidase) et une par colorimétrie (laccase). Ces enzymes contribuent à la mobilisation des éléments nutritifs séquestrés dans la matière organique du sol en lysant des macromolécules (cellulose, lignine, chitine, protéines, poly-phénols).

2. D` cuments de référence

Pritsch K, Courty P.E., Churin J.L., Cloutier-Hurteau B, Arif Ali M, Damon C, Duchemin M, Egli S, Ernst J, Fraissinet-Tachet L, Kuhar F, Legname E, Marmeisse R, Müller A, Nikolova P, Peter M, Plassard C, Richard F, Schloter M, Selosse M.A, Franc A, Garbaye J. **2011**. Optimized assay and storage conditions for enzyme activity profiling of ectomycorrhizae. *Mycorrhiza*

Courty P.E., Pritsch K., Schloter M., Hartmann A. & Garbaye J. **2005**. Activity profiling of ectomycorrhiza communities in two forest soils using multiple enzymatic tests, *New phytologist*, 167, 309-319.

Pritsch K., Raidl S., Marksteiner E., Blaschke H., Agerer R., Schloter M. and Hartmann A. **2004**. A rapid and highly sensitive method for measuring enzyme activities in single mycorrhizal tips using 4-methylumbelliferone-labelled fluorogenic substrates in a microplate system. *Journal of Microbiological Methods*, 58, 233-241.

Buée, M., Vairelles, D., Garbaye, J., **2004**. Year-round monitoring of diversity and potential metabolic activity of the ectomycorrhizal community in a beech (*Fagus sylvatica*) forest subjected to two thinning regimes. *Mycorrhiza* 15, 235-245.

3. Hygiène et sécurité

Le 2-méthoxyéthanol est un solvant classé R60, R61, R10, R20/21/22 c'est à dire qu'il altère la fertilité masculine et peut occasionner des effets néfastes à l'enfant durant la grossesse, il est également inflammable et nocif par inhalation, contact avec la peau et par ingestion. Les effluents doivent être récupérés pour retraitement. Toutes les manipulations sont à effectuer sous une hotte aspirante.

4. Principe de la méth` de

Par fluorescence, les substrats des enzymes étudiées sont couplés avec des fluorochromes (MU « MéthylUmbelliférone » et AMC « AminoMéthylCoumarine »). En solution, par exposition à une longueur d'onde précise (longueur d'onde d'excitation : 355 nm), ces fluorochromes ont la propriété de réémettre à une autre longueur d'onde (longueur d'onde d'émission : 460 nm). C'est la mesure de la quantité de photons réémise qui permet de

	Rédacteur	Vérificateurs	Approbateur
Nom :	CHURIN Jean-Louis	GARBAYE Jean, DR	MARTIN Francis, DR
Fonction :	A.I.	COURTY Pierre Emmanuel,	Directeur de l'UMR 1136
Visa :		Doctorant	

connaître la quantité de fluorochromes libres dans le milieu et ainsi de connaître la quantité de substrat hydrolysé par les enzymes. Lorsque la liaison entre le fluorochrome et le substrat reste intacte, on ne mesure que l'autofluorescence naturelle du couple substrat-fluorochrome. Par contre, si la liaison entre le substrat et le fluorochrome est rompue, on mesure la quantité de fluorochrome en solution, qui est proportionnelle à la quantité d'enzyme secrétée.

En colorimétrie (détermination de l'activité laccase), l'ABTS (diammonium 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate), substrat de l'enzyme étudiée change de couleur lorsqu'il est oxydé ; on mesure l'intensité de la couleur verte proportionnelle à la quantité d'enzyme secrétée dans le milieu.

5. matériels nécessaires

Matériel	Fournisseur	Références
Lecteur de plaque (photométrie)	Bi Rad	I Mark
Lecteur de plaque (fluorescence + UV)	Perkin-Elmer	Victor3
Logiciel WinRhizo	Regent Instruments	WINRHIZO 2009a,b,c
Plaques de filtration AcroPrep™ 96 puits 350 µl 30-40 µm PP/PE Blend	PALL Life Sciences Division Bp 9034 78102 St Germain en Laye cedex 01 30 61 38 00	PN 7267
Chambre de collection avec bloc de séparation pour plaques de 350 µl	PALL Life Sciences www.pall.com/lab renaud.valsse@eur.pe.pall.com	PN 5015
Plaques de microtitration transparentes à fond plat (96 puits)	Sarstedt	82.1581
Plaques de microtitration noires à fond plat (96 puits)	Perkin-Elmer	Optiplate™- 96F

6. Réactifs (chimiques et biologiques) et solutions mères

❖ Réactifs chimiques

Produits	Fournisseurs	Exigences	Références
HCl concentré 36%	Labosi	Stocker dans l'armoire à acides	A4705151
Acide maléique disodium 99%	Sigma Aldrich		M-9009-100g
Trizma®base	Sigma Aldrich		T-1503
Acide citrique	Sigma Aldrich		C-83 155
Acide borique	Merck		1.00165.1000
Substrats fluorescents MU-β-D-glucuronide hydrate		Stocker à - 20 °C	M-9130-100 mg

	Rédacteur	Vérificateurs	Approbateur
Nom :	CHURIN Jean-Louis	GARBAYE Jean, DR	MARTIN Francis, DR
Fonction :	A.I.	COURTY Pierre Emmanuel,	Directeur de l'UMR 1136
Visa :		Doctorant	

MU-β-D-xylopyranoside	Sigma Aldrich	Stocker à - 20 °C	M-7008-100 mg
MU-β-D-cellobioside		Stocker à 4 °C à l'abri de la lumière	M-6018-100 mg
MU-β-D-glucopyranoside		Stocker à - 20 °C	M-3633-100 mg
MU-N-acetyl-β-D-glucosaminide		Stocker à - 20 °C	M-2133-100 mg
MU-phosphate		Stocker à - 20 °C	M-8883-250 mg
L-leucine-7-AMC hydrochloride		Stocker à - 20 °C	L-2145-100 mg
ABTS	Sigma Aldrich	Stocker à 4 °C à	Fluka11565-1EA/50
2-Methoxyéthanol	Sigma Aldrich	Stocker dans l'armoire à Solvants	Fluka 64719-1 L
Fluorochrome pour sol. mère MU	Sigma Aldrich	Stocker à 4 °C	M 1381
Fluorochrome pour sol. mère AMC	Sigma Aldrich	Stocker à 4 °C	A 9891

❖ **S` luti` ns tamp` n** (à conserver au réfrigérateur à 4 °C)

Tampon universel :

Pour 1000 ml

Acide maléique.....	11,6 g
Tampon Tris	12,1 g
Acide citrique	14,0 g
Acide borique	6,3 g
Hydroxyde de sodium 1 M	488 ml
Eau distillée	QSP 1000 ml

Tampons d'incubation

Pour 1000 ml :

Prendre 100 ml de tampon universel et :

- Ajuster à PH 4,5 pour le tampon destiné à l'analyse des substrats liés à MU avec HCl
- Ajuster à PH 6,5 pour le tampon destiné à l'analyse des substrats liés à AMC avec HCl
- Compléter à un litre avec de l'eau distillée
- Stériliser à 120 °C pendant 20 mn

Solutions de rinçage à PH 4,5 et 6,5 :

Pour 300 ml :

Tampon d'incubation approprié :	200 ml
Eau distillée :	100 ml

Ajuster au PH désiré.

	Rédacteur	Vérificateurs	Approbateur
Nom :	CHURIN Jean-Louis	GARBAYE Jean, DR	MARTIN Francis, DR
Fonction :	A.I.	COURTY Pierre Emmanuel,	Directeur de l'UMR 1136
Visa :		Doctorant	

Tampon stop :

Pour 100 ml

Tampon Tris 1M : 12,1 g
Eau distillée : 100 ml

- ❖ **S'uti** ns mères de substrats (à conserver au congélateur à - 20 °C et les envelopper d'un papier d'aluminium afin de les protéger de la lumière)

Substrats fluorescents : Ils sont dissous dans 10 ml de 2-méthoxyéthanol de manière à obtenir une concentration finale de 5 mM.

	M	5 mM dans 10 ml	
MU-β-glucuronide hydrate	352,3	17,63 mg	
MU-β-D-xylopyranoside	308,3	15,42 mg	
MU-β-D-cellobioside	500,5	25,03 mg	=> limite de concentration (passer au sonicateur si besoin)
MU-β-D-glucopyranoside	338,3	16,92 mg	
MU-N-acetyl-β-D-glucosaminide	379,36	18,97 mg	
MU-phosphate	256,2	12,81 mg	
L-leucine 7-AMC	324,8	16,24 mg	

- ❖ **S'uti** ns de travail de substrat (à conserver au congélateur à - 20 °C et les envelopper d'un papier d'aluminium afin de les protéger de la lumière)

Substrats fluorescents	Concentration de la solution d'incubation (μM)	Concentration de la solution de travail (μM)	Volume de la solution mère (ml)	Volume d'eau à rajouter (ml)
MU-β-D-glucuronide hydrate	500	1500	3	7
MU-β-D-xylopyranoside	500	1500	3	7
MU-β-D-cellobioside	400	1200	2,4	7,6
MU-β-D-glucopyranoside	500	1500	3	7
MU-N-acetyl-β-D-glucosaminide	500	1500	3	7
MU-phosphate	800	2400	4,8	5,2
L-leucine-AMC	400	1200	2,4	7,6

ABTS (M = 514,62) : Il est dissous à raison de 34,3 mg dans 100 ml de solution de rinçage à pH 4,5 de manière à obtenir une concentration finale de 667 μM . Il peut être stocké à 4 °C pendant quatre semaines ;

	Rédacteur	Vérificateurs	Approbateur
Nom :	CHURIN Jean-Louis	GARBAYE Jean, DR	MARTIN Francis, DR
Fonction :	A.I.	COURTY Pierre Emmanuel,	Directeur de l'UMR 1136
Visa :		Doctorant	

❖ **Solutions mères de calibration** (à conserver au congélateur à - 20 °C)

Les fluorochromes sont dissous dans 10 ml de 2-méthoxyéthanol de manière à obtenir une concentration finale de 10 mM.

MU	17,62 mg
AMC	17,52 mg

❖ **Solutions de calibration**

Chaque série de mesure doit comprendre des points de calibration. Les solutions de calibration sont **diluées dans de l'eau déminéralisée** de manière à obtenir une concentration de **10 µM**. Ce qui permettra de préparer des solutions de calibration diluées de concentrations variables.

Concentration de la solution de calibration diluée (µM)	Volume (µl) de la solution mère de calibration à 10 µM à prélever	Volume d'eau (µl) à rajouter	Quantité de fluorochromes pmol contenus dans 100 µl
0	0	100	0
1	10	90	100
2	20	80	200
3	30	70	300
4	40	60	400
5	50	50	500

Avant la lecture sur le fluorimètre, les points de cette gamme sont déposés dans une micro-plaque noire aux concentrations suivantes :

100 µl de point de gamme,	100 µl
150 µl de tampon stop.	150 µl

7. Contraintes de la méthode

On mesure les activités enzymatiques secrétées sur les mêmes apex ectomycorhiziens.

8. Contenu du matériel

Les racines sont lavées à l'eau sans détériorer les mycorhizes. Sous loupe binoculaire, 7 apex ectomycorhiziens du morphotype étudié sensiblement de même taille, sont prélevés et déposés individuellement dans les puits des plaques de filtration contenant 150 µl de solution de rinçage. Le huitième puits ne contient pas de mycorhize (témoin négatif).

Prélever autant de séries de 7 mycorhizes qu'il y a de morphotypes à analyser.

Préparer 3 cuves pour pipettes à canaux multiples contenant respectivement pour une plaque : 16 ml de solution de rinçage, 7 ml de tampon d'incubation PH 4,5 pour les substrats MU ou PH 6,5 pour le substrat AMC et un autre contenant 16 ml de tampon stop.

Extraire la solution de rinçage à l'aide du système de filtration, éponger le fond de la plaque filtrante sur un papier absorbant et y déposer 100 µl du mélange de solution d'incubation contenant le premier substrat. Recouvrir la plaque d'un papier aluminium et la déposer sur

	Rédacteur	Vérificateurs	Approbateur
Nom :	CHURIN Jean-Louis	GARBAYE Jean, DR	MARTIN Francis, DR
Fonction :	A.I.	COURTY Pierre Emmanuel,	Directeur de l'UMR 1136
Visa :		Doctorant	

une table d'agitation tempérée à 22 °C à une vitesse de 180 RPM. La durée d'incubation optimale pour chacune des enzymes testée est indiquée dans le tableau final. Pendant l'incubation, préparer la plaque de lecture en y déposant 150 µl de tampon stop. A la fin de l'incubation, à l'aide du dispositif de filtration, transférer la solution incubée dans la plaque de micro-titration noire contenant le tampon stop, éponger le dessous de la plaque filtrante puis y déposer 150 µl de solution de rinçage et remettre sous agitation pendant 5 minutes à 22°C. Pendant ce temps déposer la plaque de lecture dans le lecteur Victor pour les tests en fluorescence ou le lecteur Bio-Rad pour le test ABTS. A la fin du rinçage, évacuer la solution de rinçage par filtration dans une microplaque prévue à cet effet et retirer la plaque filtrante, l'éponger sur du papier absorbant et y déposer le mélange de solution correspondant au substrat suivant...

Dans le cas des tests en fluorescence, dans le menu Wallac, sélectionner les puits correspondants aux cellules à analyser puis activer l'analyse. Les résultats sont donnés en temps réel.

Les microplaques sont remplies pour les différentes tâches de la manière suivante :

Plaque d'incubation pour les substrats fluorescents (plaque de microtitration noire)

Tampon d'incubation (PH 6 ou 4,5) : 66 µl soit pour 1 plaque : 7 ml
Solution de travail : 33 µl « 3,5 ml

Plaque d'incubation pour le substrat en colorimétrie (plaque transparente)

Solution d'ABTS (667 µM) 120 µl soit pour une plaques : 13 ml

Plaque de lecture pour les substrats fluorescents (plaque de microtitration noire)

Tampon stop 150 µl
Mélange solution incubée 100 µl

Plaque de lecture pour les substrats en colorimétrie (plaque transparente)

Mélange solution incubée 120 µl

Tableau des temps d'incubation

Ordre des tests	Substrats fluorescents	PH	Temps d'incubation (min)
Glucuronidase	MU-β-D-glucuronide hydrate	4,5	30
Xylosidase	MU-β-D-xylopyranoside	4,5	30
Cellobiohydrolase	MU-β-D-cellobioside	4,5	30
β-Glucosidase	MU-β-D-glucopyranoside	4,5	15
Chitinase	MU-N-acetyl-β-D-glucosaminide	4,5	15
Phosphatase acide	MU-phosphate	4,5	30
Leucine aminopeptidase	L-leucine-AMC	6,5	70
laccase	ABTS	4,5	60

	Rédacteur	Vérificateurs	Approbateur
Nom :	CHURIN Jean-Louis	GARBAYE Jean, DR	MARTIN Francis, DR
Fonction :	A.I.	COURTY Pierre Emmanuel,	Directeur de l'UMR 1136
Visa :		Doctorant	

Dès que les analyses fluorimétriques et colorimétriques sont terminées, les apex sont transférés directement au fond des puits d'une microplaque transparente à fond plat contenant 200 μ l d'eau déminéralisée afin d'être passés à l'analyseur d'images Winrhizo 2009 a,b,c qui définira la surface projetée de chaque échantillon. Les surfaces projetées présentent une corrélation linéaire avec la masse des ectomycorhizes supposées cylindriques (Buée et al 2004).

Expression des résultats

Ils sont exprimés en quantité de substrat (pmol) par unité de temps (min) et de surface projetée (mm^2) de chaque type d'ectomycorhize (pmol/ min / mm^2).

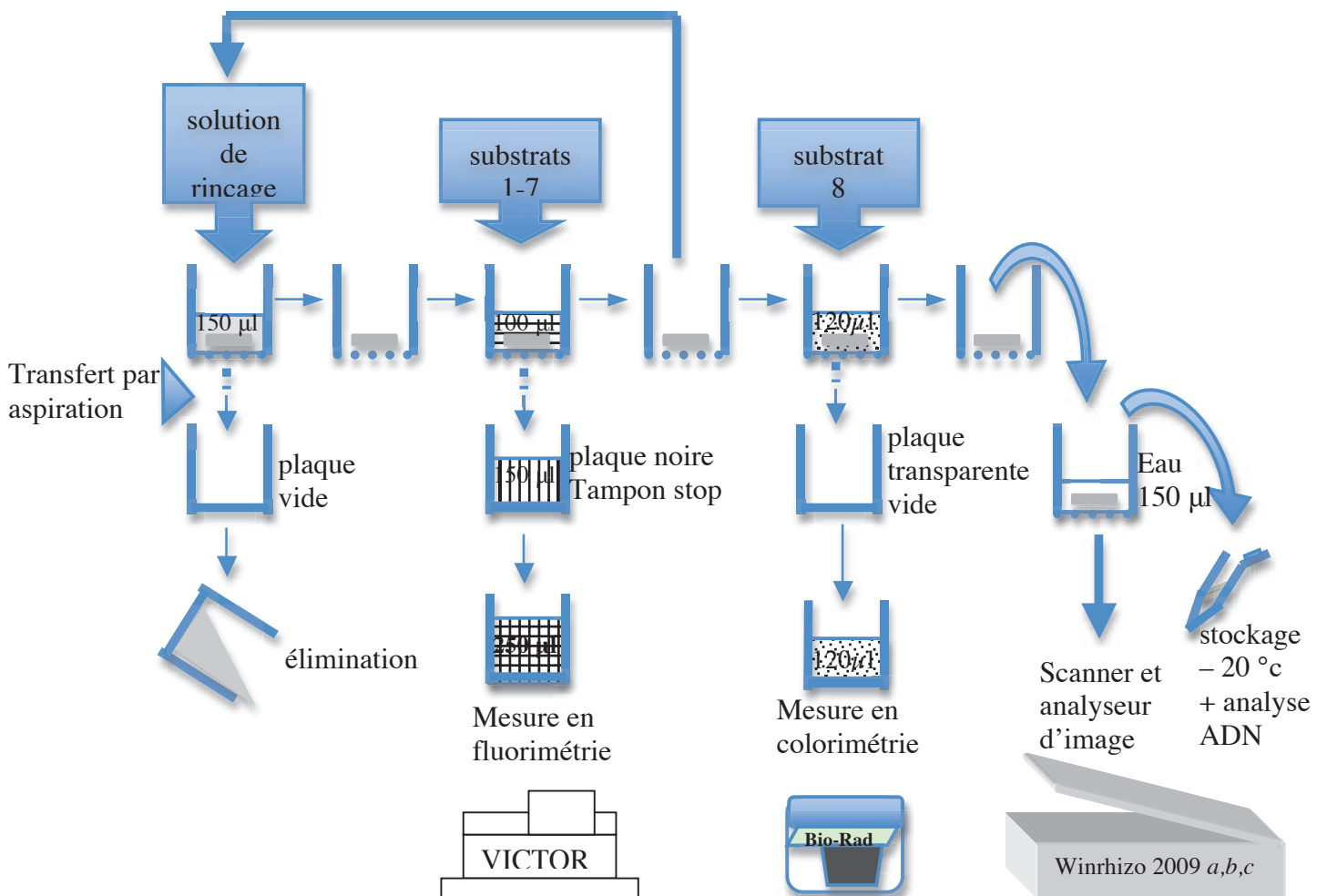


Schéma 1 : Principales phases de manipulations de tampons et solutions de travail.

	Rédacteur	Vérificateurs	Approbateur
Nom :	CHURIN Jean-Louis	GARBAYE Jean, DR	MARTIN Francis, DR
Fonction :	A.I.	COURTY Pierre Emmanuel,	Directeur de l'UMR 1136
Visa :		Doctorant	

	Rédacteur	Vérificateurs	Approbateur
Nom :	CHURIN Jean-Louis	GARBAYE Jean, DR	MARTIN Francis, DR
Fonction :	A.I.	COURTY Pierre Emmanuel,	Directeur de l'UMR 1136
Visa :		Doctorant	

Activités enzymatiques à partir de solutions de sol.

Protocole compatible avec celui des mesures sur apex ECM (même tampon et même solution de substrat)

5 plots avec 4 répétitions par bloc : 20 échantillons.

5g de sol (tamisé à 2 mm) par échantillon.

Réaliser des solutions de sol : 5 g + 45 ml d'eau distillée. Agiter la nuit à 4°C.

Prendre les solutions (agitées fortement = **suspensions** de sol) et prélever 1ml et diluer encore au 1/10 pour obtenir une **suspension** de sol à 1/100.

En microplaques, déposer 50 µl de suspension par puit pour les 6 tests Methyl UMBelliferone (MUB) à pH 4,5 (+ 4 blancs) = 24 puits (x 6 tests). Attention, l'homogénéité de la suspension est toujours la même entre les tests (les particules de sol se redéposent rapidement). Ajouter ensuite 100µl de tampon Tris maleate (pH 4,5) dans chacun des 24 puits.

En microplaque, déposer 50 µl de suspension par puit pour le test MUB (leucine) à pH 6,5 (+ 4 blancs) = 24 puits. Ajouter ensuite 100µl de tampon Tris maleate (pH 6,5) dans chacun des 24 puits.

En microplaque, déposer 100µl de suspension de sol pour le test laccase.

Ajouter au dernier moment les solutions de substrats (même concentration que pour les tests ECM) :

- 50µl pour les tests MUB

-100µl d'ABTS (2X) solubilisé dans le tampon pH 4,5.

(Incubation : la dilution finale pour les tests MUB est 1/400 et 1/200 pour laccase).

Incubation :

Chitinase, Glucosidase, Phosphatase : 15 minutes.

Cellobio, Glucuronidase, Xylosidase : 30 minutes.

Laccase : 60 minutes.

Pour le test laccase, après 60 min d'incubation, centrifuger les plaques 3 min à 5000g et récupérer 100µl du surnageant pour la lecture de DO à 415 nm.

Dilution finale (lecture) : 1/200

Pour les tests MUB, après incubation, prélever 100µl des solutions incubées et les déposer dans une nouvelle plaque contenant 100µl (par puit) de solution STOP. Centrifuger les plaques 3 min à 5000g et récupérer 100µl du surnageant pour la lecture de la fluorescence (plaque noire).

Dilution finale (lecture) : 1/800

ANNEXE 3 : COMPOSITION DES MILIEUX

MILIEU LBm

Pour 1 L :

10 g Tryptone
5 g Yeast Extract
1 g NaCl (5g en LB classique)
15 g Agar (si milieu gélosé)

QSP à 1 L avec de l'eau mQ.
Autoclaver.

MILIEU BHm (10X)

Pour 1 L :

200 mg KCl
1500 mg MgSO₄,7H₂O
800 mg NaH₂PO₄,2H₂O
650 mg (NH₄)₂SO₄
1000 mg KNO₃
200 mg CaCl₂

Ajuster à pH 6,5

QSP à 1 L avec de l'eau mQ

Pour faire du BH normal ajouter 500 mg de FeCl₃ (10X)

Autoclaver (!! Laisser un barreau magnétique dans le milieu !!)

MILIEU AB

Pour 1 L :

25 mL AB Salts 20X
25 mL AB Buffer 20X
4 g Source de carbone (ex : mannitol pour faire du ABm)
15 g Agar (si milieu gélosé)

QSP à 1 L avec de l'eau mQ
Autoclaver.

AB Salts 20X :

Pour 1L :

20 g NH₄Cl
6 g MgSO₄,7H₂O
3 g KCl
0,2 g CaCl₂
0,05 g FeSO₄,7H₂O

QSP à 1 L avec de l'eau mQ

Autoclaver (!! Laisser un barreau magnétique dans le milieu !!)

AB Buffer 20X :

Pour 1 L :

60 g K₂HPO₄
23 g NaH₂PO₄

Ajuster à pH 7
QSP à 1 L avec de l'eau mQ
Autoclaver

MILIEU TCP (adapté)

Pour 1 L :
5 g NH₄Cl
1 g NaCl
1 g MgSO₄
10 g glucose
4 g Ca₃(PO₄)₂
15 g Agar (Le mieux est de faire des bouteilles de 500 ml)

QSP à 1 L avec de l'eau mQ
Autoclaver (!! Laisser un barreau magnétique dans le milieu !!)

MILIEU CAS

Solution 1

34,63 g Pipe Na₂ Buffer (Sigma)
0,3 g KH₂PO₄
0,5 g NaCl
1 g NH₄Cl
0,246 g MgSO₄, 7H₂O
0,0147 g CaCl₂, 2H₂O

Ajuster le pH à 6,8 avec 36% HCL
QSP à 800 mL avec de l'eau mQ.
Ajouter 15 g d'Agar et autoclaver (!! Laisser un barreau magnétique dans le milieu !!)

Solution 2

4 g Glucose

QSP à 100 mL avec de l'eau mQ et autoclaver ou filtrer à 0,22 µm

Solution 3

0,0905 g Chromoazurol S (CAS)

QSP à 75 mL avec de l'eau mQ

Solution 4

0,0024 g FeCl₃ (1mM FeCl₃ 6H₂O= 270,3mg/L)

QSP à 15 mL avec de l'eau mQ (conseil : peser directement dans un mini becher pour être sûr de mettre toute la poudre en solution)

Solution 5

0,1640 HDTMA i

QSP à 60 mL avec de l'eau mQ

Mélanger doucement les solutions 4 et 3 sous agitation
Ajouter la solution 5 au mélange (4+3) toujours sous agitation
Autoclaver (!! Laisser un barreau magnétique dans le milieu !!)

Penser à autoclaver une éprouvette en verre de 100 mL

Après avoir autoclavé les solutions 1, 2 et 3+4+5, laisser la température de la solution 1 décroître jusqu'à 70°C (quand on peut poser les mains sur la bouteille sans se brûler...).

Ajouter 100 mL de la solution 2 à 100 mL du mélange 3+4+5 (attention à bien mélanger cette dernière solution avant de l'ajouter !!)

Ajouter le mélange obtenu à la solution 1 sous agitation. Et maintenant il faut se dépêcher de couler les boîtes !

ANNEXE 4 : LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS ISSUS DE CE TRAVAIL

Articles publiés

- Bacterial weathering and its contribution to nutrient cycling in temperate forest ecosystems.
Uroz S., Oger P., Lepleux C., Collignon C., Frey-Klett P. et Turpault MP.
Publié dans Research in Microbiology, Volume 162, Issue 9, November 2011, Pages 820-831.
- Abundance of Beta-Proteobacteria on mineral surfaces correlates with mineral weathering in forest soils.
Lepleux C., Turpault MP., Oger P., Frey-Klett P. et Uroz S.
Publié dans Applied and Environmental Microbiology, Volume 78, Issue 19, July 2012, Pages 7114-7119.

Article soumis

- A short-term mineral amendment impacts the mineral weathering bacterial communities in an acidic forest soil.
Lepleux C., Uroz S., Collignon C. Churin JL., Turpault MP. et Frey-Klett P.
Soumis dans : Soil Biology and Biochemistry

Article en cours de préparation

- Minerals: a true habitat for microbial communities
Lepleux C., Kelly L. C. et Uroz S.

Article non soumis à un comité de lecture international

- Caractérisation taxonomique et fonctionnelle des communautés bactériennes associées à la surface des minéraux dans les sols forestiers pauvres en nutriments: méthodologie et concepts.
Lepleux C., Uroz S., Frey-klett P. et Turpault MP.
Article écrit pour l'école doctorale RP2E

Contributions lors de colloques et séminaires

- Taxonomic and functional characterisation of the mineral associated bacterial communities : pyrosequencing FLX 454 Titanium approach (Poster)
Lepleux C., Turpault MP., Oger P., Frey-Klett P. et Uroz S.
Présenté lors des Journées des microbiologistes de l'INRA, à Poitiers, en Mai 2010.
- Taxonomic and fonctionnal characterisation of the mineral associated bacterial communities in poor nutrient forest soil (Communication Orale)
Lepleux C., Uroz S., Turpault M-P. et Frey-Klett P.
Présenté lors de la Journée des doctorants de l'école doctorale RP2E, à Nancy, en Janvier 2011
- Taxonomic and fonctionnal characterisation of mineral-associated bacterial communities in a nutrient poor forest soil (Poster). Obtention d'une bourse FEMS jeune scientifique
Lepleux C., Uroz S., Turpault M-P. et Frey-Klett P.
Présenté lors du FEMS Symposium: Ecology of soil microorganisms à Prague, en Avril 2011
- Combination of culture-independent and dependent approaches reveals positive correlation between abundance of Beta-proteobacteria and mineral weathering in nutrient-poor forest soil. (Poster)
Lepleux C., Oger P., Frey-klett P., Turpault M-P. et Uroz S.
Présenté lors de l'Ecole Thématique Expert Génomique Environnementale, à Aussois, en Mai 2012
- Mineral weathering and abundance of Betaproteobacteria in nutrient-poor forest soil. (Poster)
Lepleux C., Oger P., Frey-klett P., Turpault M-P. et Uroz S.
Présenté lors du 14th ISME Symposium: The power of the small, à Copenhague, en Août 2012

CARACTERISATION TAXONOMIQUE ET FONCTIONNELLE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES ASSOCIEES A LA SURFACE DES MINERAUX DANS LES SOLS FORESTIERS PAUVRES EN NUTRIMENTS : METHODOLOGIE ET CONCEPTS

Cendrella Lepleux^{1,2,*}, Stéphane Uroz^{1,2}, Pascale Frey-Klett¹, Marie-Pierre Turpault²

¹INRA/UHP UMR 1136 "Interactions Arbres Micro-organismes", Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux

²INRA UR 1138 "Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers", Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux

*Corresponding author : cendrella.lepleux@nancy.inra.fr

Résumé. Parmi les différents constituants du sol, les minéraux sont une ressource importante impliqués dans les cycles biologiques et la nutrition des plantes. Ils constituent en effet la principale source de cations nutritifs nécessaires au bon fonctionnement des écosystèmes forestiers. Cependant, ces nutriments sont piégés dans les minéraux et ne sont donc pas directement accessibles aux racines des arbres. Afin de pouvoir libérer les nutriments qu'ils contiennent, les minéraux doivent passer par un processus appelé l'altération minérale. Ce processus est influencé par divers facteurs : abiotiques, tels que le pH ou la circulation de l'eau, et biotiques tels que les racines des arbres ou les microorganismes du sol, dont les bactéries. Les mécanismes ainsi que les bactéries impliquées dans ce processus restent encore peu connus. Deux approches sont ici présentées pour étudier les communautés bactériennes du sol. Une approche dite non-cultivable, basée essentiellement sur des méthodes bio-informatiques et une approche dite cultivable visant à caractériser fonctionnellement ces communautés.

INTRODUCTION

Historiquement, les sols riches en nutriments ont été utilisés pour l'agriculture tandis que sur les sols pauvres, délaissés par l'Homme, se sont développées les forêts. Ces sols, caractérisés par un faible potentiel nutritionnel, ne sont pas amendés par l'Homme et sont, de plus, exploités pour la ressource bois. Dans ce milieu appauvri, les arbres doivent néanmoins trouver les nutriments inorganiques nécessaires à leur croissance. En dehors des apports liés à la pluie, aux dépôts atmosphériques et au recyclage de la matière organique via la dégradation des feuilles et des racines mortes, les minéraux du sol constituent la principale source de nutriments inorganiques nécessaires au bon fonctionnement des écosystèmes forestiers. Cependant, ces nutriments sont piégés dans les minéraux et donc ne sont pas directement accessibles aux racines des arbres. Un processus appelé l'altération minérale et mettant en œuvre divers mécanismes, permet la libération de ces nutriments inorganiques contenus dans les minéraux. Les mécanismes impliqués dans l'altération minérale sont soit abiotiques, tels que le pH, l'érosion ou encore le lessivage, soit biotiques, tels que les racines des arbres ou les microorganismes du sol (champignons et bactéries). Plusieurs études ont mis en évidence que l'altération minérale par les microorganismes du sol, et plus particulièrement par les bactéries, affectaient le cycle des ions ainsi que la nutrition des plantes en libérant des nutriments essentiels tels que le fer, le calcium, le phosphore, le magnésium ou encore le potassium à partir des minéraux [1-2].

En plus d'être la principale source de nutriments inorganiques dans les sols des écosystèmes forestiers, les minéraux constituent également une niche écologique d'importance. Le terme « niche écologique » définit la place occupée par une communauté dans un écosystème, ce qui comprend l'espace physique mais aussi le rôle fonctionnel que peut jouer cette communauté sur l'écosystème en question. En ce qui concerne les minéraux, il a été démontré que leur surface était colonisée par des bactéries spécifiques différentes du sol environnant [3]. Par ailleurs, des études ont montré que les communautés bactériennes colonisant le granite étaient différentes selon le type d'inclusion minérale (muscovite, plagioclase, quartz) [4-5] suggérant ainsi une influence de la composition du minéral sur ces bactéries. De plus, de récentes études

ont montré que la colonisation des minéraux par les bactéries était fortement liée au type de minéral. En effet, les communautés bactériennes ne sont pas les mêmes selon qu'il s'agissent de quartz, de phlogopite, de plagioclase ou d'apatite [6]. Une étude de 2006, montre également que les pins présentent une croissance plus rapide en étant mis en présence d'un mélange de quartz et biotite enrichi en bactéries connues pour être altérantes [2]. Toutes ces observations suggèrent que les minéraux constituent une niche écologique importante au sein des écosystèmes forestiers en sélectionnant des communautés bactériennes spécifiques qui, potentiellement, peuvent améliorer la croissance des arbres via une augmentation des nutriments disponibles.

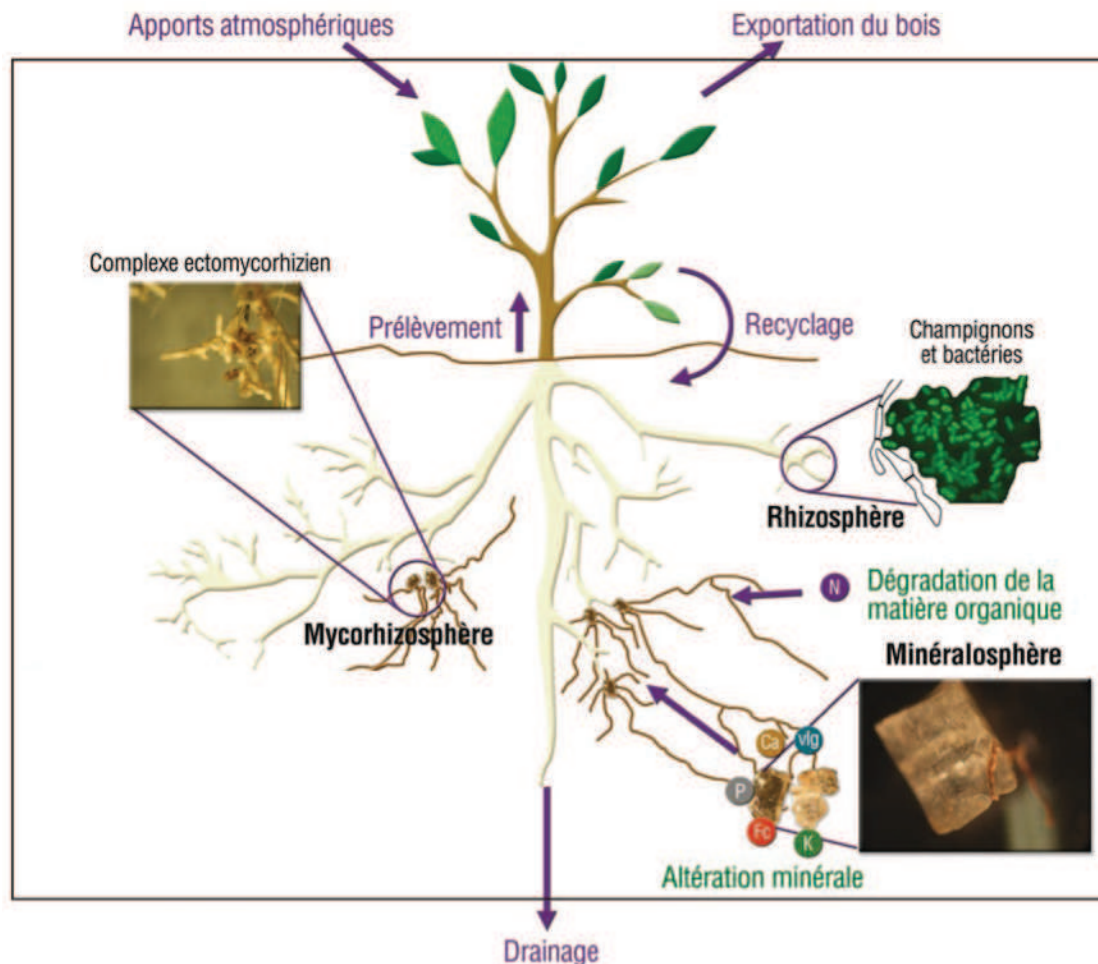


Figure 1: Implication des microorganismes dans le cycle des nutriments et la croissance des arbres en forêt. Adaptée de [7]. Ce cycle s'organise autour de cinq grandes composantes : prélèvements, recyclage, apports atmosphériques, exportation du bois et drainage. Deux d'entre elles (prélèvements et recyclage) sont fortement influencées par les micro-organismes du sol, qui colonisent différentes niches : la rhizosphère, la mycorhizosphère et la minéralosphère.

Cette niche écologique, baptisée « minéralosphère », est définie par le volume de sol proche des minéraux et influencé par les éléments nutritifs qu'ils libèrent de leur surface. La minéralosphère fait partie, avec la rhizosphère, qui qualifie le volume de sol influencé par les racines, et la mycorhizosphère, définie par le volume de sol influencé par les racines en association avec des champignons symbiotiques (dits mycorhiziens), des niches écologiques qui contribuent au bon fonctionnement des écosystèmes forestiers (Figure 1). Cependant, la minéralosphère a jusque là été peu étudiée, les minéraux du sol étant généralement écartés par tamisage des échantillons de sol.

Le sol constitue un des environnements les plus complexes en ce qui concerne la diversité bactérienne. En effet on estime qu'il y a environ 10^7 cellules par gramme de sol [8]. Il a été établi que la structure taxonomique des communautés bactériennes est influencée par de nombreux facteurs biotiques et abiotiques tels que le type de plante, d'environnement, de niche écologique ou les caractéristiques du sol [9-10]. Par exemple, on observe une diversité plus complexe dans les sols à pH neutre que dans les sols à pH acide [10]. D'autres études ont également montré un fort enrichissement en acidobactéries dans les sols plutôt secs et acides tandis que les protéobactéries dominent les sols plutôt humides [11]. En ce qui concerne l'étude de la niche écologique il a notamment été montré que les communautés bactériennes de la mycorrhizosphère étaient différentes de celles du sol environnant [12]. Au niveau de la minéralosphère, des études récentes ont montré que les communautés bactériennes variaient en fonction du type de minéral étudié, suggérant ainsi un impact de la nature chimique du minéral [13-14]. Il semblerait également qu'il y ait une corrélation entre la composition du minéral, son altération et les communautés bactériennes. En effet, il a récemment été montré une forte corrélation entre le taux d'altération du minéral et l'abondance de β -protéobactéries à sa surface [6]. Ces différences de distribution suggèrent que ces communautés ont un rôle précis selon la niche écologique qu'elles occupent dans l'écosystème où elles se trouvent.

Parallèlement à ces approches de diversité, des études ont été menées afin de déterminer les fonctions que pouvaient avoir ces communautés bactériennes. Parmi elles, certaines se sont intéressées au rôle qu'elles pouvaient avoir dans l'altération minérale. Par exemple, Calvaruso et al. en 2007, ont montré que les communautés bactériennes associées à la mycorrhizosphère sont potentiellement plus efficaces pour solubiliser le phosphore et mobiliser le fer que les communautés du sol environnant suggérant ainsi un impact de la mycorrhizosphère [12]. Cependant le potentiel d'altération de ces bactéries ne peut être évalué que sur des bactéries dites « cultivables », or peu de bactéries le sont. Il est donc assez difficile d'évaluer le potentiel d'altération d'une communauté entière.

Néanmoins, des études récentes ont mis en évidence que des bactéries appartenant aux genres *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia* et *Collimonas* étaient particulièrement altérantes et capables d'altérer des minéraux tels que l'apatite, les silicates ou le basalte [15-17]. Par conséquent, à défaut de connaître les gènes impliqués dans l'altération minérale, la présence de ces bactéries peut donner une information quant au potentiel d'altération des communautés bactériennes étudiées. Ces genres bactériens ou tout du moins la présence de séquences de leur gène 16S peuvent donc être considérés comme des bioindicateurs de l'altération minérale dans l'environnement considéré. L'évaluation du potentiel d'altération a montré que les bactéries du genre *Burkholderia* étaient altérantes dans 50% des cas tandis que celles du genre *Collimonas* l'étaient toutes. De plus, une étude récente a montré une forte corrélation entre le taux d'altération de l'apatite et l'abondance de ces deux genres à sa surface [6, 18] suggérant ainsi l'implication de ces deux genres bactériens dans l'altération minérale.

L'objectif ici est de présenter deux approches pour étudier les communautés bactériennes associées à la surface des minéraux dans un sol forestier pauvre en nutriments et ce, au niveau de leur diversité, de leur distribution et de leurs caractéristiques fonctionnelles et métaboliques. L'exemple s'appuiera sur l'analyse de grains d'apatite calibrés enterrés dans un sol forestier. Nous présenterons ici une approche polyphasique composée d'une étude dite non-cultivable basée sur l'amplification du gène 16S et d'une étude dite cultivable visant à étudier les caractéristiques fonctionnelles et métaboliques des communautés étudiées.

METHODOLOGIE

1. Site expérimental et échantillonnage

Le site expérimental de Breuil-Chenue est situé dans le Morvan (47°18'N, 4°,5E, France) à une altitude de 630m. La forêt originelle a été abattue et remplacée en 1976 par des plantations monospécifiques d'arbres de différentes espèces réparties en parcelles de 0,1 ha. [19].

L'apatite est un minéral appartenant à la famille des phosphates, sa composition par kg est de 1.8 g SiO₂, 0.5 g Al₂O₃, 0.8 g Fe₂O₃, 546.1 g CaO, 0.4 g MgO, 2.7 g Na₂O, 0.1 g MnO and 410.3 g P₂O₅ et sa formule est Ca₅(PO₄)₃(OH,F,Cl). Dans le cadre de mes travaux, des particules pure d'apatite ont été traitées par ultrason, lavées, calibrées (0,5-1mm), pesées et introduites dans des petits sachets en nylon (maille : 50µm) afin de prévenir la colonisation par les racines. Deux répliqués de ces sachets ont été enterrés sous cinq peuplement d'arbres : hêtre (*Fagus sylvatica*), épicéa de Norvège (*Picea abies*), taillis sous futaies de hêtre (*Fagus sylvatica*), sapin de Douglas (*Pseudotsuga menziesii* Franco) et pin Laricio de Corse (*Pinus nigra* Arn. ssp *laricio*). Les minéraux ont été incubés dans les conditions du sol pendant quatre ans.

2. Approche Polyphasique

A l'heure actuelle, aucun gène impliqué dans le processus de l'altération minérale par les bactéries n'est connu. Dans ce contexte, une approche polyphasique est nécessaire. Cette approche fait intervenir des méthodes dites « non-cultivables » basée sur le séquençage et des méthodes dites « cultivables » s'appuyant sur des souches cultivables en laboratoire.

2.1.Approche « non cultivable »

Cette approche est dite « non cultivable » parce qu'elle s'appuie sur l'ADN ou l'ARN extrait de l'environnement étudié et qu'elle fait intervenir des méthodes bioinformatiques et biomoléculaires. Dans notre étude, l'ADN génomique des communautés microbiennes associées à la surface des grains d'apatite et du sol environnant, a été extrait. Le gène bactérien marqueur 16S, déterminant la petite sous-unité ribosomique procaryotique et permettant une caractérisation taxonomique, a été amplifié et séquencé par une méthode de pyroséquençage. Cette méthode de séquençage de l'ADNg est plus rapide que la méthode de Sanger et permet de générer beaucoup plus de séquences. Un run de pyroséquençage 454 Titanium (dernière technologie de pyroséquençage) permet de générer environ un million de séquences. Une fois ces séquences obtenues, elles sont analysées via divers logiciels bio-informatiques tels que MOTHUR qui va permettre d'analyser en partie la diversité et la distribution d'un échantillon [20]. Dans le cadre de l'étude des communautés bactériennes, divers indices non paramétriques permettent de juger la richesse et la complexité des communautés étudiées dans un environnement donné : le ChaoI, l'ACE et l'indice de Shannon. Le ChaoI et l'ACE sont des indices de richesse qui permettent d'estimer l'homogénéité de la communauté étudiée et l'indice de Shannon est un indice de diversité permettant d'en estimer la complexité. Ces indices sont à mettre en parallèle d'autres données présentées sous la forme de courbes de raréfaction. Ces courbes rendent compte du nombre d'OTUs (Organism Taxonomic Units) observées en fonction du nombre d'OTUs obtenues. Une OTU correspond, en écologie microbienne, à la notion d'espèce autrement dit, à une homologie de séquence de 97%. Lorsque la courbe atteint un plateau c'est que toutes les espèces présentes dans un échantillon ont été séquencées, y compris les espèces rares. Dans ce

cas, difficilement réalisable dans le sol du fait de la forte complexité des communautés microbiennes telluriques, l'effort de séquençage est dit suffisant pour expliquer toute la diversité d'un échantillon.

Les séquences de 16S obtenues peuvent également être analysées via des plateformes bioinformatiques telles que MG-RAST [21] permettant ainsi leur caractérisation taxonomique. Ces logiciels bioinformatiques vont permettre de déterminer l'abondance relative des espèces obtenues ou leur distribution à travers plusieurs échantillons. Dans cette étude, on peut, par exemple, déterminer quelles sont les OTUs présentes uniquement à la surface de l'apatite ou celles qui, au contraire, sont présentes à la surface de l'apatite et dans le sol environnant. De plus, la caractérisation taxonomique peut également conduire à l'identification de groupes fonctionnels connus grâce auxquels on va potentiellement pouvoir prédire une partie des capacités fonctionnelles de la communauté.

L'approche « non-cultivable » nous permet donc d'avoir une approche de la diversité des communautés bactériennes ainsi qu'une appréciation de leur affiliation phylogénétique, de leur distribution et de leur complexité.

2.2. Approche « cultivable »

Seulement 0,1 à 1% des bactéries du sol sont dites « cultivables », c'est-à-dire qu'on peut les cultiver sur des milieux de cultures appropriés. Cette faible proportion signifie qu'il est difficile d'étudier les caractéristiques métaboliques et fonctionnelles des différentes bactéries composant une communauté bactérienne en laboratoire. L'approche biologique est néanmoins essentielle car elle permet d'apprécier les caractéristiques fonctionnelles et métaboliques de souches cultivables. Par ailleurs, l'étape de caractérisation de souches bactériennes cultivables permet d'identifier des groupes fonctionnels et/ou des bioindicateurs ou d'en caractériser de nouveaux, qui permettront éventuellement de préciser le rôle que joue les communautés bactériennes dans l'écosystème considéré. Dans notre étude, c'est le caractère altérant des communautés bactériennes associées à la surface des minéraux qui est particulièrement étudié.

Les souches bactériennes sont d'abord isolées à partir des grains d'apatite sur un milieu nutritif gélosé (TSA 10% (Tryptic Soil Agar)). Ces souches sont ensuite utilisées pour estimer le potentiel d'altération et les caractéristiques métaboliques et fonctionnelles des communautés bactériennes étudiées.

Afin de déterminer le potentiel d'altération de ces souches, un test d'altération en microplaque est utilisé (Figure 2). Ce test consiste à mettre en contact les bactéries à cribler avec un minéral, la biotite, et ce, dans une solution nutritive dépourvue de fer. La seule source de fer dans le système est donc localisée dans le minéral. Dans les conditions de l'expérience, cet élément chimique est utilisé comme traceur de l'altération étant donné que le minéral est altéré de façon stœchiométrique. Après 48h d'incubation, les microplaques sont révélées avec des indicateurs colorés spécifiques permettant de mesurer les quantités de fer et de protons libérés et d'estimer ainsi le potentiel d'altération des bactéries testées.

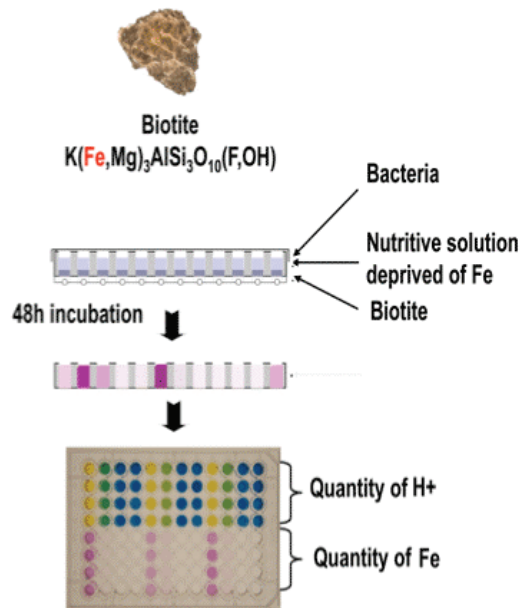


Figure 2: Test d'altération en microplaque. Le bromophénolgreen est utilisé comme indicateur coloré pour révéler la quantité de protons libérés tandis que le ferrospectral est utilisée pour le Fer.

Au niveau de la caractérisation métabolique, des microplaques commerciales, telles que les microplaques BIOLOG[®], permettent de tester les souches avec 71 sources de carbone ainsi que leur sensibilité à 23 solutions chimiques (antibiotiques, NaCl, pH, etc.). L'ensemble de ces tests renseigne sur les capacités métaboliques et physiologiques des communautés étudiées : les différentes sources de carbone consommées, leur résistance ou non aux antibiotiques testés, etc.

En parallèle de ces différents tests, le génotypage des souches isolées permet de les identifier et d'établir une relation entre leur appartenance taxonomique et leurs caractéristiques métaboliques et fonctionnelles. Cette méthode passe par l'amplification du gène 16S à l'aide d'amorces spécifiques, et son séquençage pour chacune des souches génotypées. Une fois les séquences obtenues, une comparaison avec des séquences connues, sur une base de donnée informatique telle que NCBI (National Center for Biotechnologies Information) par exemple, permet de les identifier. C'est cette étape d'identification qui va permettre de trouver des bactéries bioindicatrices ou appartenant à des groupes fonctionnels et ainsi de préciser le rôle et les fonctions potentielles de la communauté étudiée dans l'environnement considéré. La mise en relation de ces différents résultats permet aussi d'identifier des souches bactériennes modèles sur lesquelles des travaux plus approfondis (génétique, séquençage de génome) peuvent être réalisés.

L'approche cultivable nous permet donc d'avoir des informations sur les capacités métaboliques et fonctionnelles des bactéries testées pouvant éventuellement conduire à la découverte de bactéries modèles qui pourront être utilisées pour déterminer les gènes impliqués dans l'altération minérale. Cette approche permet également d'établir une relation taxonomie/fonction pour chacune des souches isolées ce qui est essentiel pour comprendre le rôle de ces communautés dans l'environnement étudié.

CONCLUSION

Le sol est un des environnements les plus complexe, il est difficile d'en étudier les communautés bactériennes de manière exhaustive. Néanmoins, la complémentarité des approches cultivable et non-cultivable permet d'appréhender au maximum les communautés

bactériennes du sol. Avec ces deux approches il est en effet possible d'apprécier les fonctions potentielles, les caractéristiques métaboliques, la distribution et la taxonomie de ces communautés bactériennes, permettant ainsi de mieux comprendre leur rôle (Figure 3). De plus, à ces méthodes peut s'ajouter une approche non biologique visant à étudier l'altération globale des minéraux considérés et les caractéristiques du sol (pH, teneur en eau, etc).

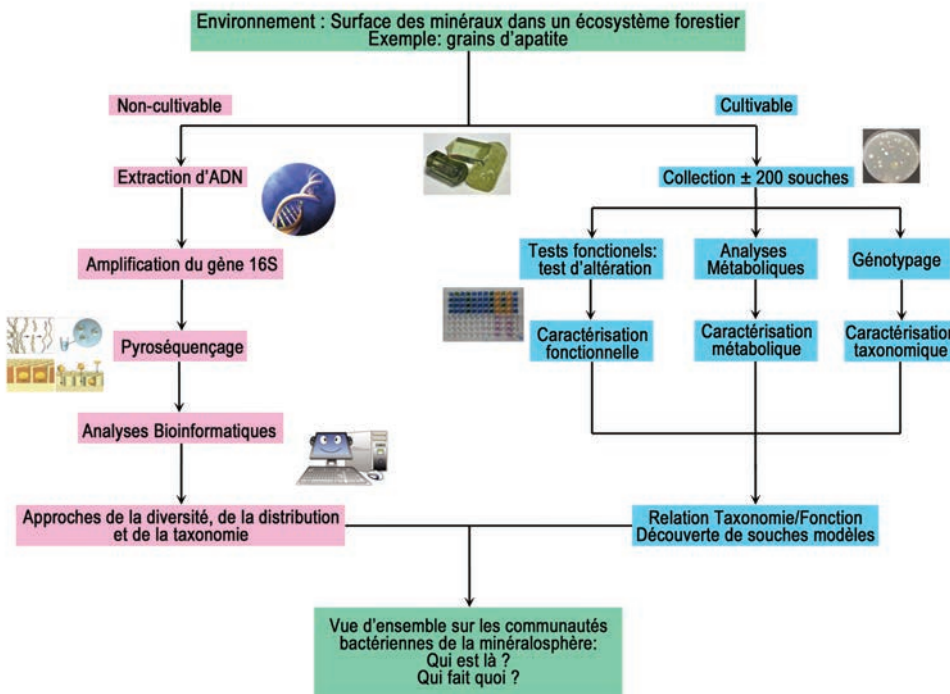


Figure 3: Schéma récapitulatif des approches « cultivables » et « non cultivables ».

REMERCIEMENTS

Ma thèse est financée par l'INRA et la Région Lorraine. Les auteurs remercient Emmanuelle Morin pour son aide en bioinformatique, et les Dr. Pascal Simonet et Stéphane Vuilleumier pour leurs conseils.

REFERENCES

- [1] Barker, W., Welch, S. and Banfield, J. *Biogeochemical weathering of silicate minerals*. In *Geomicrobiology : Interactions between microbes and minerals*. Mineralogical Soc America Washington. (1997), 391-428.
- [2] Calvaruso, C., Turpault, M-P. and Frey-Klett, P. *Root-associated bacteria contribute to mineral weathering and to mineral nutrition in trees: a budgeting analysis*. Applied and Environmental microbiology, 72 (2), 1258-1266, (2006).
- [3] Certini, G., Campbell, C.D. and Edwards, A.C. *Rock fragments in soil support a different microbial community*. Soil Biology and Biochemistry, 36, 1119-1128, (2004).
- [4] Gleeson, DB., Clipson, N., Melville, K., Gadd, GM. and McDermott, FP. *Characterization of fungal community structure on a weathered pegmatitic granite*. Microbial Ecology, 0, 1-9, (2005).
- [5] Gleeson, D., Macdermott, F. and Clipson N. *Structural diversity of bacterial communities in a heavy metal mineralized granite outcrop*. Environmental Microbiology, 8 (3), 383-393, (2006).
- [6] Uroz, S., Turpault, MP., Delaruelle, C., Mareschal, L., Pierrat JC. and Frey-Klett, P. *Minerals affect the specific diversity of forest soil bacterial communities*. In press.
- [7] Uroz, S., Calvaruso, S., Turpault, M-P. and Frey-Klett, P. *Altération microbienne des minéraux*. Biofutur, 268, 37-41, (2006).
- [8] Roesch, L.F.W., Fulthorpe, R.R., Rive, A., Casella, G., Hadwin, A.K.M., Kent, D.A., Daroub, S.H., Camargo, F.A.O., Farmerie, W.G. and Triplett, E.W. *Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity*. International Society for Microbial Ecology, 1, 283-290, (2007).
- [9] Hackl, E., Zechmeister-Boltenster, S., Bodrossy L. and Sessitsch, A. *Comparison of diversities and compositions of bacterial population inhabiting natural forest soils*. Applied and Environmental Microbiology, 70 (9), 5057-5065, (2004).
- [10] Fierer, N. and Jackson, R.B. *The diversity and biogeography of soil bacterial communities*. PNAS, 103 (3), 626-631, (2006).
- [11] Castro, H.F., Classen, A.T., Austin, E.E., Norby, R.J. and Schadt, C.W. *Soil microbial community responses to multiple experiment climate change drivers*. Applied and Environmental Microbiology, 76 (4), 999-1007, (2010).
- [12] Calvaruso, C., Turpault, M.P., Leclerc, E. and Frey-Klett, P. *Impact of ectomycorrhizosphere on the functional diversity of soil bacterial and fungal communities from a forest stand in relation to nutrient mobilization processes*. Microbial Ecology, 54, 567-577, (2007).
- [13] Carson, J.K., Campbell, L., Rooney, D., Clipson, N. and Gleeson, D.B. *Minerals in soil select distinct bacterial communities in their microhabitats*. FEMS Microbial Ecology, 67(3), 141-145, (2009).

- [14] Hackl, E., Pfeffer, M., Donat, C., Bachmann, G. and Zechmeister-Boltenstern, S. *Composition of the microbial communities in the mineral soil under different types of natural forest*. Soil Biology and Biochemistry, 37, 661-671, (2005).
- [15] Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, MP., Pierrat, JC., Mustin, C. and Frey-Klett, P. *Effect of the ectomycorrhizosphere on the genotypic and metabolic diversity of the bacterial communities involved in mineral weathering in a forest soil*. Applied and Environmental Microbiology, 73(9), 3019-3027, (2007).
- [16] Wu, L., Jacobson, AD. And Hausner, M. *Characterization of elemental release microbe-granite interactions at T=28°C*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 72, 1076-109, (2008)
- [17] Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, MP., Sarriguet, A., de Boer, W., Leveau, JHJ., and Frey-Klett, P. *Efficient mineral weathering is a distinctive functional trait of the bacterial genus Collimonas*. Soil Biology and Biochemistry, 73 (9), 3019-3027, (2009).
- [18] Lepleux, C. et al. In preparation.
- [19] Ranger J. and Turpault MP. *Input-output nutrient budgets as a diagnostic-tool for the sustainability of forest management*. Forest Ecology and Management 122, 7-16, (1999).
- [20] Schloss, PD., Wescott, SL., Ryabin, T., Hall, JR., Hartmann, M., Hollister, EB., Lesniewski, RA., Oakley, BB., Parks, DH., Robinson, CJ., Stres, B., Thallinger, GG., Van Horn, DJ. And Weber, CF. *Introducing mothur : Open-source, Platform-independent, community-supported, software for describing and comparing microbial communities*. Applied and Environmental Microbiology, 75, 7537-7541, (2009).
- [21] Meyer, F., Paarman, D., Souza, MD., Olson, R., Glass, EM., Kubal, M., Paczian, T., Rodriguez, A., Stevens, R., Wilke, A., Wilkening, J. and Edwards, RA. *The metagenomics RAST server-a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes*. BMC Bioinformatics, 9 (386), (2008).

Taxonomic and functional characterization of the mineral associated bacterial communities : pyrosequencing FLX 454 Titanium approach



Lepleux, C.¹, Uroz, S.^{1,2}, Turpault, M.P.², Oger, P.³ and Frey-Klett, P.¹

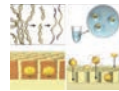
¹INRA, UMR1136 INRA-Nancy Université "Interactions Arbres Micro-organismes", Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France
²INRA, UR1138 "Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers", Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France
³CNRS, UMR5570, Laboratoire Sciences de la Terre, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 Allée d'Italie, 69364 Lyon cedex 07, France

Introduction:

Among the different soil constituents, mineral particles which resulted from rock erosion have been poorly investigated by microbiologists. However, minerals are important because they are the main reservoir of inorganic nutrients for the long-lasting functioning of the forest ecosystem. Nevertheless, most of the nutrients are trapped in these minerals and so are not directly accessible to the tree roots. In the soil, nutrients are released by biotic and abiotic processes in which microorganisms (bacteria and fungi) play a major role: the mineral weathering (Uroz *et al.*, 2009). The bacteria which are involved in this process are not well known, but recent studies have shown in forest soil that bacteria belonging to Betaproteobacteria and particularly *Burkholderia* and *Collimonas* genera harboured efficient mineral weathering potential (Uroz *et al.*, 2007). In this study, we used pyrosequencing 454 Titanium tags spanning the V5 and V6 hyper-variable regions of the 16S rRNA gene sequence to analyze the composition of the bacterial communities colonizing apatite surfaces and the surrounding soil in an acidic forest soil. We also began a cultivation-dependent approach to characterize the functional and physiological characteristics of the mineral associated bacteria.

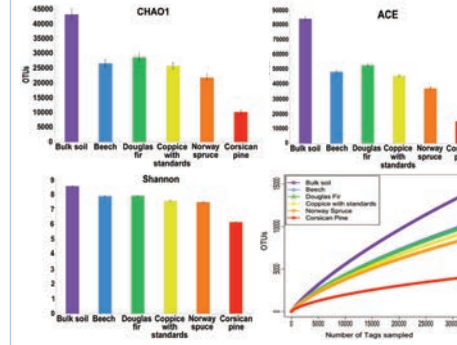
Methods

- ◆ Pure mineral particles of apatite were treated ultrasonically, washed, calibrated (mesh size 0.5-1mm), weighed and introduced in little nylon bags (mesh size 50 µm) preventing root colonization. This bags were ground under five tree species (Beech, Douglas fir, Coppice with standards, Norway spruce and Corsican pine) in the organo-mineral horizon during 4 years.
- ◆ Bacterial collections from apatite surface under different tree species
- ◆ Functional screening of each bacterial isolate for their mineral weathering potential using a microplate assay
- ◆ Taxonomical identification (16S rDNA) of the bacterial isolates
- ◆ Extraction of meta-genomic DNA from the apatite surface and the surrounding bulk soil under the different tree species.
- ◆ Amplification of the 16S rDNA (V5-V6 region) using the 454 Titanium pyrosequencing adaptors
- ◆ Bioinformatic analyses of the data (Mothur and R software, MG-RAST)



Results: Cultivation independent approach

1. Non parametric indices and rarefaction curve



Non-parametric indices were calculated using the MOTHUR software. The rarefaction curves were created using the R software (97% threshold).

- ✓ ¼ 454 Titanium RUN generated ca. 230 000 16SrDNA sequences ranging from 250 to 350 bp
- ✓ The bulk soil bacterial community is characterised by a highest diversity than the one colonizing apatite surface
- ✓ Bacterial diversity on apatite surface is similar under the five tree species except for Corsican pine

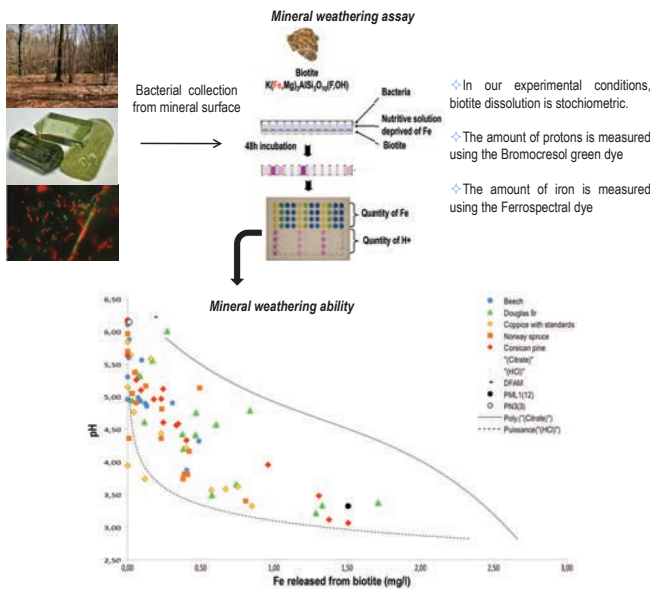
Experimental site

The Breuil-Chenu experimental site is located in the Morvan (47°18'N, 4°5'E, France), on a plateau with an altitude of 630 m. This site is characterized by acid and nutrient poor soil.



Results: Cultivation dependant approach

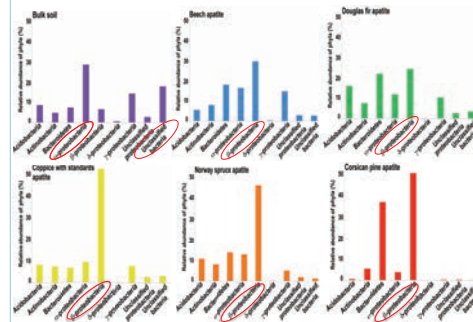
1. Screening of bacterial collections



- ◆ In our experimental conditions, biotite dissolution is stoichiometric.
 - ◆ The amount of protons is measured using the Bromocresol green dye
 - ◆ The amount of iron is measured using the Ferrospectral dye
- ✓ Most of the mineral associated bacteria have the ability to weather mineral
 - ✓ Contrasted distribution of the bacterial isolates according to the tree species
 - ✓ More mineral weathering bacterial strains were isolated from Corsican pine, coppice with standards and Douglas fir than under Beech
 - ✓ Bacterial isolates harbouring the most efficient mineral weathering potential come from Douglas and Corsican pine

2. Phylogenetics analyses

Major phyla



Relative abundance of most present phyla (80% threshold) calculated with the platform MG-RAST

- ✓ The bulk soil is dominated by α-proteobacteria and unclassified bacteria
- ✓ The apatite surface is dominated by β-proteobacteria

The ten most present genera

Genus	Relative abundance (%)	Genus	Relative abundance (%)	Genus	Relative abundance (%)	Genus	Relative abundance (%)	Genus	Relative abundance (%)	Genus	Relative abundance (%)
Unclassified Bacteria	12.97	Burkholderia	10.25	Burkholderia	12.76	Opilobacteraceae	16.11	Burkholderia	7.63	Burkholderia	5.16
Acidobacterium	6.26	Paenibacillus	7.72	Paenibacillus	4.48	Burkholderia	11.03	Acidobacterium	6.25	Paenibacillus	16.39
Unclassified proteobacteria	4.96	Unclassified Opilobacteraceae	4.91	Unclassified proteobacteria	3.51	Acidobacterium	6.05	Chloroflexus	4.10	Unclassified Opilobacteraceae	3.28
Geometricum	3.23	Acidobacterium	4.29	Unclassified Burkholderia	3.41	Chloroflexus	2.33	Streptomyces	3.33	Streptomyces	3.31
Unclassified Rhizobiales	3.04	Actinobacteria	3.65	Caulobacterium	3.37	Unclassified proteobacteria	2.95	Unclassified Burkholderia	2.49	Paenibacillus	1.40
Unclassified Opilobacteraceae	2.96	Unclassified Burkholderia	3.06	Unclassified Burkholderia	2.98	Unclassified Burkholderia	2.22	Unclassified Burkholderia	2.45	Unclassified Burkholderia	1.14
Streptomyces	2.72	Unclassified proteobacteria	2.96	Unclassified Burkholderia	1.95	Unclassified Burkholderia	2.19	Unclassified Burkholderia	1.62	Herbaspirillum	0.94
Actinobacteria	2.80	Unclassified Burkholderia	2.94	Unclassified Proteobacteria	1.42	Unclassified Proteobacteria	2.05	Unclassified Proteobacteria	1.45	Caulobacterium	0.89
Paenibacillus	1.96	Caulobacterium	3.32	Streptomyces	1.36	Streptomyces	1.08	Unclassified Opilobacteraceae	1.34	Paenibacillus	0.80

The ten most abundant genera and their relative abundance (threshold ≥95%) was calculated with the platform MG-RAST

- ✓ The most abundant genus present on the apatite surface is *Burkholderia*
- ✓ The most abundant genus in the bulk soil was *Acidobacterium*

The ten most present species

Genus	Species	Genus	Species	Genus	Species	Genus	Species	Genus	Species	Genus	Species
Acidobacterium	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Collimonas</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>
Acidobacterium	<i>Collimonas</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Collimonas</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>
Acidobacterium	<i>Dakibella</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Collimonas</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Collimonas</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>
Acidobacterium	<i>Collimonas</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Collimonas</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Collimonas</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>
Streptomyces	<i>Streptomyces</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Opilobacterium</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>
Streptomyces	<i>Streptomyces</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>
Streptomyces	<i>Streptomyces</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>
Streptomyces	<i>Streptomyces</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>
Streptomyces	<i>Streptomyces</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>
Streptomyces	<i>Streptomyces</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>

The ten most abundant OTUs (threshold ≥96%) generated using MOTHUR and BLAST (NCBI)

- ✓ *Burkholderia* is the genus dominating the apatite surface (except under Coppice with standards where it is the *Collimonas* genus)

Conclusions

- ◆ The bulk soil is a reservoir of bacterial diversity
- ◆ The apatite surfaces are mainly colonised by bacteria belonging to genera known for their mineral weathering ability : *Burkholderia* and *Collimonas*
- ◆ Most of the bacteria present on apatite surface are capable of weathering minerals
- ◆ Our results suggest a tree species impact on the distribution of the bacterial communities on the mineral surfaces and their mineral weatherability

Acknowledgements: This work was performed under support from Lorraine Region, INRA and grants from EC2CO-INSU

References:

Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.P., Pierrat, J.C., Mustin, C. and Frey-Klett P. 2007. Effect of the mycorrhizosphere on the genotypic and metabolic diversity of the bacterial communities involved in mineral weathering. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (9):3019-3027
 Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.P. and Frey-Klett, P. 2009. Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. *Trends in microbiology*, 17 (8):378-387.

Taxonomic and functional characterization of mineral-associated bacterial communities in a nutrient-poor forest soil



Lepleux, C.^{1,2}, Frey-Klett, P.¹, Turpault, M.P.² and Uroz, S.^{1,2}

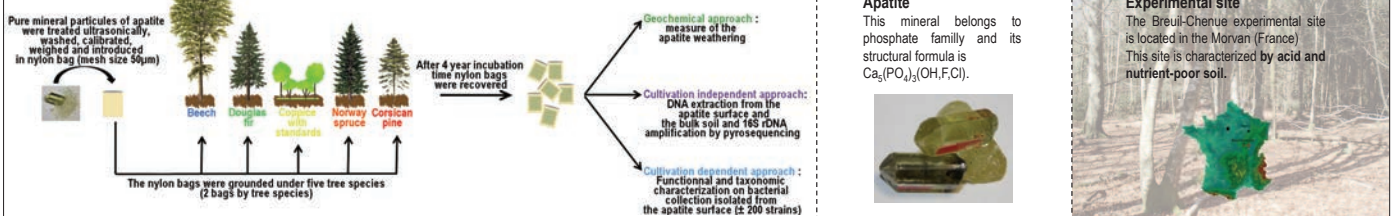
¹INRA, UMR1136 INRA Nancy Université "Interactions Arbres Micro-organismes", Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France
²INRA, UR1138 "Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers", Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France



Introduction:

- + In forest ecosystems, soil minerals are the main reservoir of inorganic nutrients.
- + The **mineral weathering** is the mechanisms who released the inorganics nutrients trapped in these minerals (Uroz et al., 2011).
- + β -proteobacteria belonging to genus *Burkholderia* and *Collimonas* harboured efficient mineral weathering potential (Uroz et al, 2007).
- + In this study we combine **geochemical** and **cultivation independent** and **dependent** approaches to analyse the taxonomic and functional diversity of the mineral associated bacterial communities which are currently poorly known.

Methods



Apatite
 This mineral belongs to phosphate family and its structural formula is $Ca_5(PO_4)_3(OH,F,Cl)$.

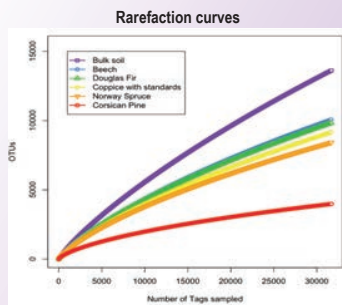
Experimental site
 The Breuil-Chenuve experimental site is located in the Morvan (France). This site is characterized by acid and nutrient-poor soil.



CULTIVATION INDEPENDENT APPROACH

CULTIVATION DEPENDENT APPROACH

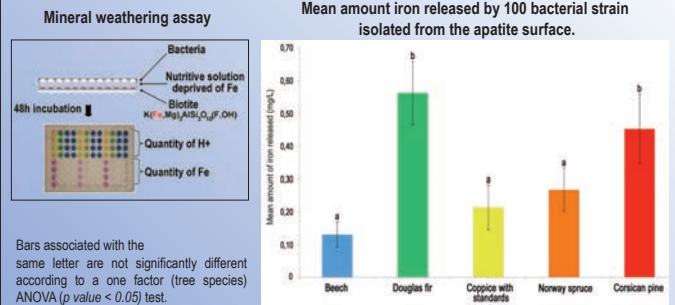
1. Diversity analyses



$\frac{1}{4}$ 454 Titanium run generated ca. 230 000 16S rDNA sequences ranging from 250 to 350pb. The rarefaction curves were created using the R software (97% threshold).

Mineralosphere bacterial communities \neq Bulk soil bacterial communities

1. Fonctionnal characterization



Bars associated with the same letter are not significantly different according to a one factor (tree species) ANOVA (p value < 0.05) test.

- + Most of isolated strains are able to weather biotite : **weathering community**
- + Bacterial isolates harbouring the most efficient mineral weathering potential come from Douglas fir and Corsican pine : **tree species effect**

2. Taxonomic characterization

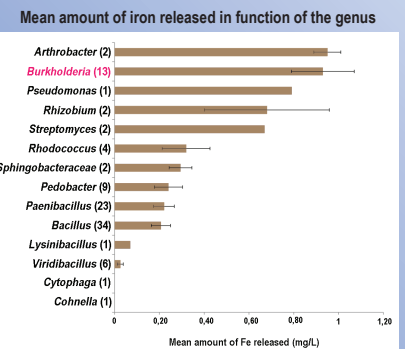
2. Phylogenetic analyses

Bulk soil		Beech		Douglas Fir		Coppice with standards		Norway Spruce		Corsican Pine	
Genus	Relative abundance (%)	Genus	Relative abundance (%)	Genus	Relative abundance (%)	Genus	Relative abundance (%)	Genus	Relative abundance (%)	Genus	Relative abundance (%)
Unclassified Bacteria	12,87	<i>Burkholderia</i>	18,25	<i>Burkholderia</i>	12,76	<i>Oxalobacteraceae</i>	16,11	<i>Burkholderia</i>	37,53	<i>Burkholderia</i>	34,68
<i>Acidobacterium</i>	6,38	<i>Pedobacter</i>	7,72	<i>Pedobacter</i>	4,49	<i>Burkholderia</i>	15,83	<i>Acidobacterium</i>	6,25	<i>Pedobacter</i>	16,39
Unclassified γ -proteobacteria	6,26	<i>Chloriflexus</i>	5,88	<i>Acidobacterium</i>	2,82	Unclassified <i>Oxalobacteraceae</i>	8,99	<i>Pedobacter</i>	8,54	<i>Chloriflexus</i>	12,62
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	4,98	Unclassified <i>Oxalobacteraceae</i>	4,91	Unclassified <i>proteobacteria</i>	3,51	<i>Acidobacterium</i>	6,65	<i>Chloriflexus</i>	4,19	Unclassified <i>Oxalobacteraceae</i>	3,28
<i>Gemmatimonas</i>	3,23	<i>Acidobacterium</i>	4,29	Unclassified bacteria	2,41	<i>Chloriflexus</i>	2,83	<i>Streptomyces</i>	3,33	<i>Streptomyces</i>	3,51
Unclassified β -proteobacteria	3,04	<i>Alteromonas</i>	3,65	<i>Curtobacterium</i>	2,37	Unclassified γ -proteobacteria	2,55	Unclassified γ -proteobacteria	2,49	<i>Paenibacillus</i>	1,48
Unclassified α -proteobacteria	2,86	Unclassified <i>Arthrobacteraceae</i>	3,06	Unclassified <i>Sphingobacteriaceae</i>	2,08	Unclassified <i>Burkholderiales</i>	2,22	Unclassified <i>Burkholderiales</i>	2,45	Unclassified <i>Burkholderiales</i>	1,14
<i>Bradyrhizobium</i>	2,72	Unclassified <i>parvotubercularia</i>	2,56	Unclassified <i>Bradyrhizobiales</i>	1,95	Unclassified bacteria	2,19	Unclassified <i>Alphaproteobacteria</i>	1,62	<i>Herbaspirillum</i>	0,94
<i>Alteromonas</i>	2,68	Unclassified <i>Bradyrhizobiales</i>	2,24	Unclassified <i>Proteobacteria</i>	1,42	Unclassified <i>Proteobacteria</i>	2,05	Unclassified <i>Proteobacteria</i>	1,45	<i>Curtobacterium</i>	0,89
<i>Pedobacter</i>	1,96	<i>Curtobacterium</i>	2,32	<i>Bradyrhizobium</i>	1,38	<i>Streptomyces</i>	1,88	Unclassified <i>Oxalobacteraceae</i>	1,34	<i>Pandora</i>	0,88

The ten most abundant genera and their relative abundance (threshold $\geq 95\%$) was calculated using MOTHUR software and NCBI (BLAST). (**Herbaspirillum*, *Janthinobacterium*, *Collimonas*)

In bracket the number of strain identified. 101 strains were identified based on their 16S rDNA gene sequence.

The mineralosphere niche is colonised by specific bacterial communities mainly composed of β -proteobacteria which are weathering efficient

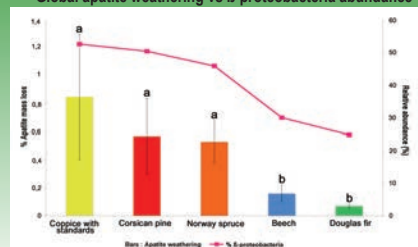


Burkholderia = the most efficient mineral weathering genus

Burkholderia is the most abundant genus at the apatite surface whatever the tree specie : **specific community**

GEOCHEMICAL APPROACH

Global apatite weathering vs β -proteobacteria abundance



Bars associated with the same letter are not significantly different according to a one factor (tree species) ANOVA (p value $< 0,05$) test.

Strong correlation between apatite weathering and the β -proteobacteria abundance : **specific community**

Acknowledgements: This work was performed under support from Lorraine Region, INRA and grants from EC2CO-INSU. The authors thanks FEMS for providing a Young scientist grant and Dr. Philippe LEMANCEAU for his support.

References: Uroz, S., Calhassou, C., Turpault, M.P., Piarat, J.C., Muslin, C. and Frey-Klett P. 2007. Effect of the mycorrhizosphere on the genotypic and metabolic diversity of the bacterial communities involved in mineral weathering. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (9):3019-3027
 Uroz, S., Oger, P., Lepleux, C., Collignon, C., Frey-Klett, P. and Turpault, M.P. 2011. Bacterial weathering and its contribution to nutrient cycling in temperate forest ecosystems. *Research in Microbiology*, in press.

Combination of culture-independent and dependent approach reveals positive correlation between abundance of Beta-proteobacteria and mineral weathering in nutrient-poor forest soil



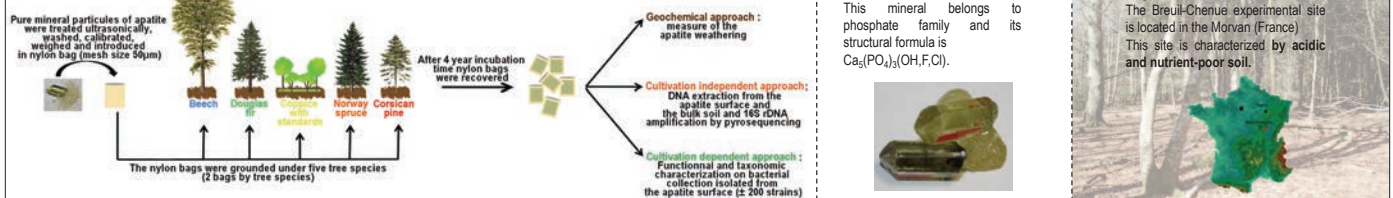
Lepleux, C.^{1,2}, Oger, P.³, Frey-Klett, P.¹, Turpault, M.P.² and Uroz, S.^{1,2}
¹INRA, UMR1136 INRA Nancy Université "Interactions Arbres Micro-organismes", Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France
²INRA, UR1138 "Strogéochimie des Ecosystèmes Forestiers", Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France
³CNRS, UMR5570, Laboratoire Sciences de la Terre, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 Allée d'Italie, 69364 Lyon cedex 07, France



Introduction:

- + In temperate forest ecosystems developed on acidic soils, **soil minerals are the main reservoir of inorganic nutrients** for the long-lasting functioning of the ecosystem.
- + These inorganic nutrients are released from soil minerals through **mineral weathering** processes involving abiotic (pH, temperature) and biotic factors (soils microorganisms) (Uroz et al., 2011).
- + Bacterial communities colonizing the mineral surface (=mineralosphere niche) are **poorly known**. Nevertheless, **Beta-proteobacteria**, isolated from the rhizosphere and belonging to the *Burkholderia* and *Collimonas* genera harboured **efficient mineral weathering potentials** (Uroz et al., 2007).
- + In this study we combined **geochemical** and **cultivation-independent** and **-dependent** approaches to analyse the taxonomic and functional diversity of the bacterial communities colonizing the mineralosphere.

Methods

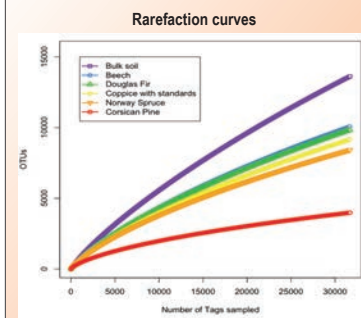


Apatite
 This mineral belongs to phosphate family and its structural formula is $Ca_5(PO_4)_3(OH,F,Cl)$.

Experimental site
 The Breuil-Chenue experimental site is located in the Morvan (France). This site is characterized by acidic and nutrient-poor soil.

CULTIVATION INDEPENDENT APPROACH

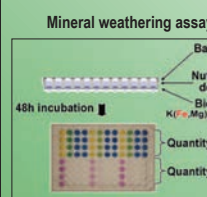
1. Diversity analyses



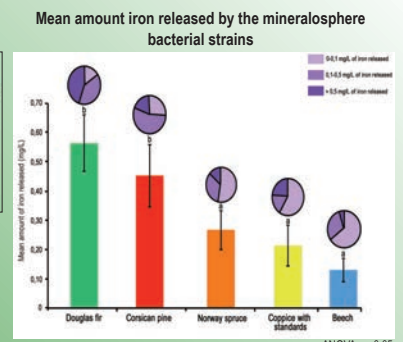
¼ 454 Titanium run generated ca. 230000 16S rDNA sequences ranging from 250 to 350pb. The rarefaction curves were calculated using the MOTHUR software and created using the R software (97% threshold) for a similar amount of reads for each condition (ca. 31 600 reads)

CULTIVATION DEPENDENT APPROACH

1. Functional characterization



Bars associated with the same letter are not significantly different according to a one factor (tree species) ANOVA test ($p=0.0001$). The pie charts represent the distribution of the 101 bacterial isolates belonging to three different classes of weathering efficacy according to a χ^2 test ($p=0.0069$).



ANOVA, $p<0.05$

Mineralosphere bacterial communities \neq Bulk soil bacterial communities

- + Most of the bacterial isolates are able to weather biotite : **weathering community**
- + Bacterial isolates harbouring the most efficient mineral weathering potential come from Douglas fir and Corsican pine, suggesting a **tree species effect**

2. Phylogenetic analyses

The ten most abundant genera

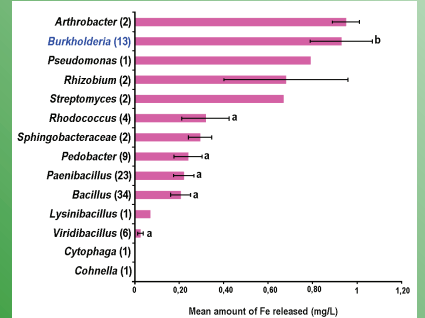
Bulk soil	Beech	Douglas Fir	Coppice with standards	Norway Spruce	Corsican Pine						
Genus	Relative abundance (%)	Genus	Relative abundance (%)	Genus	Relative abundance (%)						
Unclassified Bacteria	12.37	<i>Burkholderia</i>	18.25	<i>Burkholderia</i>	12.76	<i>Oxalobacteraceae</i>	16.11	<i>Burkholderia</i>	37.03	<i>Burkholderia</i>	34.58
<i>Acidobacterium</i>	8.38	<i>Pedobacter</i>	7.72	<i>Pedobacter</i>	4.48	<i>Burkholderia</i>	13.33	<i>Acidobacterium</i>	8.25	<i>Pedobacter</i>	16.39
Unclassified proteobacteria	8.26	<i>Chitinophaga</i>	5.98	<i>Acidobacterium</i>	2.82	Unclassified Oxalobacteraceae	8.99	<i>Pedobacter</i>	8.54	<i>Chitinophaga</i>	12.82
<i>Rhodospirillum</i>	4.90	Unclassified proteobacteria	4.91	Unclassified proteobacteria	2.51	<i>Acidobacterium</i>	6.65	<i>Chitinophaga</i>	4.19	Unclassified Oxalobacteraceae	5.28
<i>Gemmatimonas</i>	3.23	<i>Acidobacterium</i>	4.29	Unclassified bacteria	2.41	<i>Chitinophaga</i>	2.83	<i>Streptomyces</i>	3.33	<i>Streptomyces</i>	3.51
Unclassified Rhizobiales	3.04	<i>Alphaproteobacteria</i>	3.65	<i>Curtobacterium</i>	2.37	Unclassified proteobacteria	2.55	Unclassified proteobacteria	2.49	<i>Paenibacillus</i>	1.40
Unclassified (proteobacteria)	2.86	Unclassified Zanthoxylales	3.06	Unclassified Spirochaetales	2.08	Unclassified Burkholderiales	2.22	Unclassified Bradyrhizobiales	2.45	Unclassified Burkholderiales	1.14
<i>Bradyrhizobium</i>	2.72	Unclassified proteobacteria	2.38	Unclassified Bradyrhizobiales	1.95	Unclassified bacteria	2.19	Unclassified Rhizobiales	1.82	<i>Herbaspirillum</i>	0.84
<i>Alphaproteobacteria</i>	2.80	Unclassified Bradyrhizobiales	2.94	Unclassified Proteobacteria	1.42	Unclassified Proteobacteria	2.05	Unclassified Curtobacteriales	1.45	<i>Curtobacterium</i>	0.89
<i>Pedobacter</i>	1.96	<i>Curtobacterium</i>	2.32	<i>Bradyrhizobium</i>	1.36	<i>Streptomyces</i>	1.98	Unclassified Oxalobacteraceae	1.34	<i>Pandora</i>	0.80

The ten most abundant genera and their relative abundance (threshold $\geq 95\%$) was calculated using MOTHUR software and NCBI (BLAST).
 (**Herbaspirillum*, *Janthinobacterium*, *Collimonas*)

101 bacterial isolates were identified based on their 16S rDNA sequence. The bars represent the mean amount of iron released by the bacterial strains of a given genus. The number of bacterial strains isolated per genus is presented between brackets. For the genera with a minimum of three bacterial strains identified, a one factor (genus) ANOVA was performed ($p=0.0001$). Bars associated with the same letters are not significantly different.

2. Taxonomic characterization

Mean amount of iron released in function of the genus



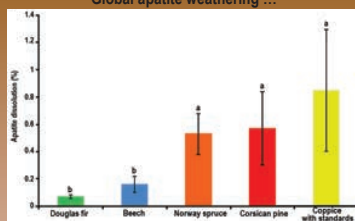
ANOVA, $p<0.05$

Burkholderia is the most abundant genus at the apatite surface whatever the tree species : **specific community**

Burkholderia = the most efficient mineral weathering genus

GEOCHEMICAL APPROACH

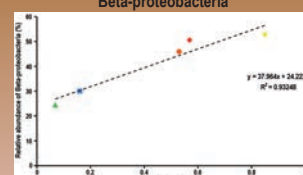
Global apatite weathering ...



Bars associated with the same letter are not significantly different according to a one factor (tree species) ANOVA ($p=0.0467$) test.

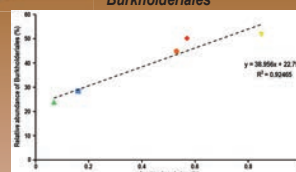
ANOVA, $p<0.05$

... vs the relative abundance of Beta-proteobacteria



A positive and significant correlation was found between the apatite dissolution and the abundance of 16S rDNA gene sequences assigned to the Beta-proteobacteria class ($p=0.0076$)

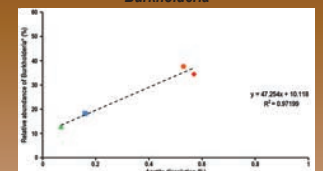
... vs the relative abundance of Burkholderiales



A positive and significant correlation was found between the apatite dissolution and the abundance of 16S rDNA gene sequences assigned to the *Burkholderiales* family ($p=0.0026$)

Significant and positive correlation between apatite weathering and the β -proteobacteria abundance : specific community

... vs the relative abundance of Burkholderia



When considered without the Coppice with standards, a positive and significant correlation was found between the apatite dissolution and the abundance of 16S rDNA gene sequences assigned to the *Burkholderia* genus ($p=0.0089$)

Acknowledgements: This work was performed under support from Lorraine Region, INRA and grants from EC2CO-INSU and ANR JC.

References: Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.P., Pignatelli, J.C., Madin, C. and Frey-Klett, P. 2007. Effect of the mycorrhizosphere on the genotypic and metabolic diversity of the bacterial communities involved in mineral weathering. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (9): 3019-3027
 Uroz, S., Oger, P., Lepleux, C., Collignon, C., Frey-Klett, P. and Turpault, M.P. 2011. Bacterial weathering and its contribution to nutrient cycling in temperate forest ecosystems. *Research in Microbiology*, 162: 820-831.

Mineral weathering and abundance of Beta-proteobacteria in nutrient-poor forest soil

Lepleux, C.^{1,2}, Oger, P.³, Frey-Klett, P.¹, Turpault, M.P.² and Uroz, S.^{1,2}



¹ INRA, UMR1136 INRA/Université de Lorraine "Interactions Arbres Micro-organismes", Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France
² INRA, UR1138 "Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers", Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France
³ CNRS, UMR5570, Laboratoire Sciences de la Terre, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 Allée d'Italie, 69364 Lyon cedex 07, France



INTRODUCTION:

+In temperate forest ecosystems developed on acidic soils, **soil minerals are the main reservoir of inorganic nutrients** for the long-lasting functioning of the ecosystem.
 +These inorganic nutrients are released from soil minerals through **mineral weathering** processes involving abiotic (pH, temperature) and biotic factors (soils microorganisms)
 +In this study we combined **cultivation-independent** and **-dependent** and **geochemical** approaches to analyse the taxonomic and functional diversity of the bacterial communities colonizing the **mineralosphere**.

METHODS

Pure mineral particules of apatite in nylon bag (mesh size 50µm) → Beech Douglas fir Coppice with standards Norway spruce Corsican pine → Mineral recovering 4 years → $Ca_5(PO_4)_3(OH,F,Cl)$

The nylon bags were grounded under five tree species in the Breuil Chevne experimental site (France) characterized by acidic and nutrient-poor soil (2 bags by tree species)

Geochemical approach: measure of the apatite weathering
Cultivation independent approach: DNA extraction from the apatite surface and the bulk soil and 16S rDNA amplification by pyrosequencing
Cultivation dependent approach: Functional and taxonomic characterization on bacteria isolated from the apatite surface (± 100 strains)

CULTIVATION INDEPENDENT APPROACH

Diversity analyses : Rarefaction curves

¼ 454 Titanium run generated ca. 230000 16S rDNA sequences ranging from 250 to 350pb. The rarefaction curves were calculated using the MOTHUR software and created using the R software (97% threshold) for a similar amount of reads for each condition (ca. 31 600 reads)

CULTIVATION DEPENDENT APPROACH

Functional characterization : Weathering efficacy of mineralosphere isolates

Bars associated with the same letter are not significantly different according to a one factor (tree species) ANOVA test ($p=0.0001$). The pie charts represent the distribution of the 101 bacterial isolates belonging to three different classes of weathering efficacy according to a χ^2 test ($p=0.0069$). ANOVA, $p<0.05$

Mineralosphere bacterial communities ≠ Bulk soil bacterial communities

+ Minerals harbour a mineral weathering community
 + The most efficient weathering bacterial isolates come from Douglas fir and Corsican pine : tree species effect

Phylogenetic analyses: The ten most abundant genera

Bulk soil		Beech		Douglas Fir		Coppice with standards		Norway Spruce		Corsican Pine	
Genus	Relative abundance (%)	Genus	Relative abundance (%)	Genus	Relative abundance (%)	Genus	Relative abundance (%)	Genus	Relative abundance (%)	Genus	Relative abundance (%)
Unclassified Bacteria	12.97	<i>Burkholderia</i>	18.25	<i>Burkholderia</i>	12.76	<i>Oxalobacteraceae</i>	16.11	<i>Burkholderia</i>	37.03	<i>Burkholderia</i>	34.08
Acidobacterium	6.38	<i>Pedobacter</i>	7.72	<i>Pedobacter</i>	4.48	<i>Burkholderia</i>	13.03	<i>Acidobacterium</i>	6.25	<i>Pedobacter</i>	16.39
Unclassified proteobacteria	6.26	<i>Chitinophaga</i>	5.58	<i>Acidobacterium</i>	2.82	Unclassified Oxalobacteraceae	8.99	<i>Pedobacter</i>	8.54	<i>Chitinophaga</i>	12.82
Rhodospirillum	4.90	Unclassified Oxalobacteraceae	4.91	Unclassified proteobacteria	2.51	Unclassified Oxalobacteraceae	6.85	<i>Chitinophaga</i>	4.10	Unclassified Oxalobacteraceae	9.28
Gemmatimonas	3.23	<i>Acidobacterium</i>	4.29	Unclassified bacteria	2.41	<i>Chitinophaga</i>	2.83	<i>Streptomyces</i>	3.33	<i>Streptomyces</i>	3.51
Unclassified Rhizobiales	3.04	<i>Actinobacteria</i>	3.65	<i>Caribacterium</i>	2.37	Unclassified proteobacteria	2.55	Unclassified proteobacteria	2.49	<i>Paenibacillus</i>	1.40
Unclassified α -proteobacteria	2.85	Unclassified Xanthomonadaceae	3.96	Unclassified Sphingobacteriaceae	2.08	Unclassified Burkholderiales	2.22	Unclassified Bradyrhizobiales	2.45	Unclassified Burkholderiales	1.14
Bradyrhizobium	2.72	Unclassified γ -proteobacteria	2.38	Unclassified bacteria	1.95	Unclassified Rhizobiales	2.19	Unclassified Rhizobiales	1.82	<i>Herbaspirillum</i>	0.94
Actinobacteria	2.80	Unclassified β -proteobacteria	2.94	Unclassified Proteobacteria	1.42	Unclassified Proteobacteria	2.05	Unclassified Proteobacteria	1.45	<i>Caribacterium</i>	0.89
<i>Pedobacter</i>	1.96	<i>Caribacterium</i>	2.32	<i>Bradyrhizobium</i>	1.36	<i>Streptomyces</i>	1.98	Unclassified Oxalobacteraceae	1.34	<i>Pedobacter</i>	0.80

The ten most abundant genera and their relative abundance (threshold $\geq 95\%$) was calculated using MOTHUR software and NCBI (BLAST).
 (**Herbaspirillum*, *Janthinobacterium*, *Collimonas*)

Taxonomic characterization : Weathering efficacy and genus belonging

The bars represent the mean amount of iron released by the bacterial strains of a given genus. The number of bacterial strains isolated per genus is presented between brackets. For the genera with a minimum of three bacterial strains identified, a one factor (genus) ANOVA was performed ($p=0.0001$). Bars associated with the same letters are not significantly different. $n=101$; $p<0.05$.

Burkholderia is the most abundant genus at the apatite surface whatever the tree species : specific community

The mineralosphere niche is colonised by specific bacterial communities mainly composed of Beta-proteobacteria which are weathering efficient

Burkholderia : the most efficient mineral weathering genus

GEOCHEMICAL APPROACH

Global apatite weathering ...

Bars associated with the same letter are not significantly different according to a one factor (tree species) ANOVA ($p=0.0467$) test.

... vs the relative abundance of Beta-proteobacteria

A positive and significant correlation was found between the apatite dissolution and the abundance of 16S rDNA gene sequences assigned to the Beta-proteobacteria class ($p=0.0076$)

... vs the relative abundance of Burkholderiales

A positive and significant correlation was found between the apatite dissolution and the abundance of 16S rDNA gene sequences assigned to the *Burkholderiales* family ($p=0.0026$)

Significant and positive correlation between apatite weathering and the β -proteobacteria abundance : specific community

Altération bactérienne des minéraux dans les écosystèmes forestiers pauvres en nutriments: Analyse des communautés bactériennes et identification des mécanismes impliqués.

Résumé :

Dans les écosystèmes forestiers pauvres en nutriments, les minéraux du sol constituent la principale source de nutriments inorganiques nécessaires à leur bon fonctionnement. Néanmoins ces nutriments ne sont pas directement accessibles aux racines des arbres. C'est l'action conjointe de facteurs abiotiques, comme le pH ou la circulation de l'eau, et biotiques comme les racines ou les microorganismes du sol dont les bactéries, qui vont conduire à l'altération de ces minéraux. A ce jour, nos connaissances sur les communautés bactériennes impliquées dans le processus d'altération et leur distribution dans des sols forestiers restent limitées, notamment à des habitats tels que la rhizosphère et la mycorrhizosphère. Les objectifs de cette thèse étaient de caractériser les communautés bactériennes colonisant les minéraux du sol, leur aptitude à altérer les minéraux et enfin d'identifier les gènes bactériens impliqués.

La combinaison d'approches cultivable, non cultivable et de biogéochimie sur des minéraux enterrés pendant 4 ans dans un sol forestier, a démontré que leur surface était colonisée par des communautés bactériennes spécifiques, capables d'altérer les minéraux et présentant des capacités métaboliques limitées, suggérant que ce support pourrait être considéré comme un habitat : la minéralosphère. La relation minéral/bactéries a été testée *in situ* via un amendement minéral sur une plantation et a mis en évidence l'impact de la disponibilité en nutriments sur la structuration des communautés bactériennes capables d'altérer les minéraux. L'étude génétique réalisée sur la souche modèle PML1(12) a révélé l'implication de plusieurs mécanismes dans la fonction altération.

Mots-clefs: Altération (géologie), Géochimie (environnement), Bactéries, Ecosystèmes forestiers, Cycle des éléments minéraux, Génie génétique, *β -proteobacteria*, *Burkholderia*, Minéralosphère, Métagénomique, Approche fonctionnelle, Biodisponibilité des nutriments.

Mineral weathering bacterial communities in nutrient-poor forest soil : analysis of the bacterial communities and genes involved

Abstract :

In nutrient-poor forest ecosystems, minerals are the main source of inorganic nutrients for the long-lasting functioning of the forests. However, these nutrients are not directly accessible to the tree roots. It is the joined action of abiotic factors, such as pH and water circulation, and biotic factors such as tree roots and soil microorganisms, and notably bacteria, which leads to the solubilisation of these minerals. To date, our knowledge of the bacterial communities involved in the mineral weathering process and their distribution in forest soils is very limited and remains restricted to habitats such as the rhizosphere and mycorrhizosphere. The goals of this PhD thesis were to characterise the mineral associated bacterial communities, their ability to weather minerals and finally to identify the bacterial genes involved in the mineral weathering process.

The combination of geochemical, cultivation-dependent and -independent approaches applied on minerals grounded in a forest soil during 4 years, revealed that the mineral associated bacterial communities were specific, able to weather minerals and had restricted metabolic abilities. These results suggest that minerals could be considered as a true ecological habitat: the mineralosphere. The mineral/bacteria relationship was tested *in situ* through a mineral amendment applied on a small-scale plantation, which has highlighted that the nutrient availability impacted the functional structure of the mineral weathering bacterial communities. At least, random mutagenesis applied on a model mineral weathering bacterial strain revealed that its mineral weathering ability resulted from several molecular mechanisms.

Key words: Weathering (geology), geochemistry (environment), bacteria, Forest ecosystem, Inorganic nutrients cycle, Genetics, *β -proteobacteria*, *Burkholderia*, Mineralosphere, Metagenomics, Functional approach, Nutrient bioavailability.