

1 Annexes

Annexe 1: Protocole de mise en place des microcosmes pour l'herbicide FUEGO®

Protocole de la mise en place des microcosmes

FUEGO®

1 Préparation des microcosmes

- Ajouter 80g de sol dans des récipients cylindriques fermés de 120 ml, remplissant ainsi $\frac{3}{4}$ de leur volume.

2 Calculs des concentrations d'herbicide

- Calculer le volume de pesticide à appliquer par microcosme.
- Calcul du volume de solution nécessaire pour humidifier 80g de sol \rightarrow 4 ml.

Etape	Calcul	Résultat
Concentration métazachlore	500 g/L	500 00 $\mu\text{g/ml}$
Dose recommandée	1,5 L/ha	750g/ha
Poids terre/ha	% caillou x profondeur x densité apparente	3500 tonnes
Dose recommandée par g de terre	750 g/ha \div 3500 tonnes	0,21428 $\mu\text{g/g}$
Dose 10x	0,21428 $\mu\text{g/g}$ x 10	2,1428 $\mu\text{g/g}$
Dose 0,1x	0,21428 $\mu\text{g/g}$ \div 10	0,021428 $\mu\text{g/g}$
Concentration (dose 10x) dans 80g de terre	2,1428 $\mu\text{g/g}$ x 80 g	171,2 $\mu\text{g}/80\text{g}$
Concentration par ml	171,2 μg \div 4 ml	42,8 $\mu\text{g/ml}$

3 Préparation des solutions mères

- Dilution 100x : 10 μl de FUEGO® + 990 μl d'eau pour obtenir 5000 $\mu\text{g/ml}$.
- Dilution 117x : 427 μl de la solution 100x + 49,573 ml d'eau pour obtenir 42,8 $\mu\text{g/ml}$.

4 Préparation des solutions d'application

Dose	Solution d'application
Dose 10x	427 μl de la solution diluée 100x + 49,573 ml d'eau
Dose 1x	5 ml de la solution 10x + 45 ml d'eau
Dose 0,1x	5 ml de la solution 1x + 45 ml d'eau

5 Application des solutions

- Ajouter 4 ml d'eau distillée aux microcosmes contrôle.

- Ajouter 4 ml des différentes solutions préparées (10x, 1x, 0,1x) aux microcosmes correspondants.
- Homogénéiser chaque microcosme.

6 Mise en incubation

- Placer les microcosmes dans une étuve à 22°C dans l'obscurité.
- Aérer les microcosmes sous hottes à flux laminaire pendant 15 minutes chaque semaine.

Protocole de la mise en place des microcosmes

CARPATUS®

1 Préparation des microcosmes

- Ajouter 80g de sol dans des récipients cylindriques fermés de 120 ml, remplissant ainsi $\frac{3}{4}$ de leur volume.

2 Calculs des concentrations d'herbicide

- Calculer le volume de pesticide à appliquer par microcosme.
- Calcul du volume de solution nécessaire pour humidifier 80g de sol \rightarrow 4 ml.

Etape	Calcul	Résultat
Concentration diflufenican	400 g/L	500 00 $\mu\text{g/ml}$
Dose recommandée	0,6 L/ha	240g/ha
Poids terre/ha	% caillou x profondeur x densité apparente	3500 tonnes
Dose recommandée par g de terre	240 g/ha \div 3500 tonnes	0,0686 $\mu\text{g/g}$
Dose 10x	0,0686 $\mu\text{g/g}$ x 10	0,686 $\mu\text{g/g}$
Dose 0,1x	0,0686 $\mu\text{g/g}$ \div 10	0,00686 $\mu\text{g/g}$
Concentration (dose 10x) dans 80g de terre	0,686 $\mu\text{g/g}$ x 80 g	54,86 $\mu\text{g}/80\text{g}$
Concentration par ml	54,86 μg \div 4 ml	6,867 $\mu\text{g/ml}$

3 Préparation des solutions mères

- Dilution 100x : 10 μl de CARPATUS® + 990 μl d'eau pour obtenir 5000 $\mu\text{g/ml}$.
- Dilution 292x : 171,2 μl de la solution 100x + 49,829 ml d'eau pour obtenir 6,867 $\mu\text{g/ml}$.

4 Préparation des solutions d'application

Dose	Solution d'application
Dose 10x	171,2 μl de la solution diluée 100x + 49,829 ml d'eau
Dose 1x	5 ml de la solution 10x + 45 ml d'eau
Dose 0,1x	5 ml de la solution 1x + 45 ml d'eau

5 Application des solutions

- Ajouter 4 ml d'eau distillée aux microcosmes contrôle.
- Ajouter 4 ml des différentes solutions préparées (10x, 1x, 0,1x) aux microcosmes correspondants.
- Homogénéiser chaque microcosme.

6 Mise en incubation

- Placer les microcosmes dans une étuve à 22°C dans l'obscurité.
- Aérer les microcosmes sous hottes à flux laminaire pendant 15 minutes chaque semaine.

Protocole d'analyse de l'activité enzymatique avec FDA (Fluorescéine Diacétate)

1 Préparation du tampon phosphate

- Peser 8,7g de K_2HPO_4 et 1,3g de KH_2PO_4 .
- Déposer les pesées dans une bouteille de 1 litre et y ajouter 800 ml d'eau distillée.
- Placer la bouteille sur un agitateur magnétique.
- Ajuster le pH à 7,6.
- Compléter avec 200 ml d'eau distillée.
- Mettre dans l'autoclave pour 20 minutes à 120°C. Préparer la solution au moins un jour à l'avance pour laisser le tampon refroidir après l'autoclave.

2 Préparation des solutions de sol

- Peser 1,250g de sol frais dans un falcon 50 ml.
- Ajouter 20ml de tampon phosphate dans chaque falcon.
- Passer les falcons dans un agitateur orbital à 335 RPM pendant 10 minutes.
- Sonifier les falcons pendant 2 minutes.
- Repasser les falcons dans l'agitateur pendant 5 minutes.

3 Préparation des solutions stocks de substrat et dilution

- Solution de FDA 1 : 50 mg de FDA + 10ml d'acétone pur dans un falcon 50ml. Protéger le falcon avec de l'aluminium pour protéger de la lumière, et conserver cette solution stock dans le frigo.
- Solution de FDA 2 (Dilution de substrat, à réaliser le jour de l'utilisation) : 400 μ l de FDA 1 + 4,8ml de tampon phosphate + 4,8ml d'acétone. Protéger le falcon avec de l'aluminium pour protéger de la lumière, puis jeter après la manipulation.

4 Préparation de la plaque 96 puits

- Prendre une microplaque à 96 puits (FLUOTRACT 200 noir)
- Remplir une ligne/colonne contrôle, avec seulement du tampon phosphate (220 μ l) et de solution substrat FDA 2 (30 μ l) afin de contrôler la fluorescence de la FDA.
- Remplir les colonnes avec du sol (25 μ l), du tampon phosphate (195 μ l) et de la solution substrat FDA 2 (30 μ l). Commencez par mettre le tampon phosphate dans tous les puits, ensuite le sol, et finalement, en dernier, la solution substrat FDA 2 rapidement.

5 Mesures de fluorescence

- Allumer l'ordinateur et le spectromètre (TECAN Spark). Lumière bleue quand il s'allume – Lumière rose quand le TECAN est prêt à l'emploi.
- Placer la plaque dans le TECAN.
- Choisir un programme qui convient au type de sol (ici avec un gain 30).
- Les mesures sont réalisées par cinétique toutes les 5 minutes pendant 2h05 (25 cycles).

Modèle de plaque pour la mesure de l'activité enzymatique :

- TP												
- Sol	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
- FDA 2												
A	- 220 µl - 30µl											
B	-195 µl - 25 µl - 30µl											
C	-195 µl - 25 µl - 30µl											
D	-195 µl - 25 µl - 30µl											
E	-195 µl - 25 µl - 30µl											
F	-195 µl - 25 µl - 30µl											
G	-195 µl - 25 µl - 30µl											
H	-195 µl - 25 µl - 30µl											
ech :	ctrl 1	ctrl 2	ctrl 3	[0,1] 1	[0,1] 2	[0,1] 3	[1] 1	[1] 2	[1] 3	[10] 1	[10] 2	[10] 3

Ligne A = ligne contrôle

Droite de calibration

1 Préparation solution stock standard et dilution

- Solution de Fluo 1 : 6,7mg de fluorescéine + 13,4ml d'acétone dans un falcon 50ml. Protéger le falcon avec de l'aluminium pour protéger de la lumière, et conserver cette solution stock dans le frigo.
- Solution de Fluo 2 : 200µl de Fluo 1 dans 7,8ml d'acétone. (Dilution de substrat, à réaliser le jour de l'utilisation).
- Solution de fluo 3 : 1000µl de Fluo 2 + 19ml d'acétone

2 Préparation de la plaque

- 25µl de solution de sol (ctrl) sont placés dans chaque puits, auquel sont ajoutés des volumes variables de solution tampon et de solution standard, afin de réaliser des solutions à concentrations croissantes.
- Réaliser une mesure sur le TECAN, en utilisant le même programme que pour le test enzymatique FDA. Une seule mesure (cycle 1) est nécessaire pour la droite de calibration.

- TP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
- Sol												
- Fluo 3												
A	- 225 µl - 25 µl - 0µl	- 225 µl - 25 µl - 0µl	- 225 µl - 25 µl - 0µl	- 185 µl - 25 µl - 40µl	- 185 µl - 25 µl - 40µl	- 185 µl - 25 µl - 40µl						
B	- 220 µl - 25 µl - 5µl	- 220 µl - 25 µl - 5µl	- 220 µl - 25 µl - 5µl	- 180 µl - 25 µl - 45µl	- 180 µl - 25 µl - 45µl	- 180 µl - 25 µl - 45µl						
C	- 215 µl - 25 µl - 10µl	- 215 µl - 25 µl - 10µl	- 220 µl - 25 µl - 5µl	- 175 µl - 25 µl - 50µl	- 175 µl - 25 µl - 50µl	- 175 µl - 25 µl - 50µl						
D	- 210 µl - 25 µl - 15µl	- 210 µl - 25 µl - 15µl	- 210 µl - 25 µl - 15µl	- 170 µl - 25 µl - 55µl	- 170 µl - 25 µl - 55µl	- 170 µl - 25 µl - 55µl						
E	- 205 µl - 25 µl - 20µl	- 205 µl - 25 µl - 20µl	- 205 µl - 25 µl - 20µl	- 165 µl - 25 µl - 60µl	- 165 µl - 25 µl - 60µl	- 165 µl - 25 µl - 60µl						
F	- 200 µl - 25 µl - 25µl	- 200 µl - 25 µl - 25µl	- 200 µl - 25 µl - 25µl	- 145 µl - 25 µl - 80µl	- 145 µl - 25 µl - 80µl	- 145 µl - 25 µl - 80µl						
G	- 195 µl - 25 µl - 30µl	- 195 µl - 25 µl - 30µl	- 195 µl - 25 µl - 30µl	- 125 µl - 25 µl - 100µl	- 125 µl - 25 µl - 100µl	- 125 µl - 25 µl - 100µl						
H	- 190 µl - 25 µl - 35µl	- 190 µl - 25 µl - 35µl	- 190 µl - 25 µl - 35µl	- 105 µl - 25 µl - 120µl	- 105 µl - 25 µl - 120µl	- 105 µl - 25 µl - 120µl						

Protocole adapté de Beguiristain Thierry.

Protocole MicroResp™

Dans cette expérimentation, le dispositif expérimental MicroResp™ sera utilisé afin de quantifier l'émission de CO₂ de différents échantillons de sol. Ce dernier est constitué d'une plaque à 96 puits profonds, d'un dispositif de remplissage, d'un plateau coulissant en plexiglass, d'un tapis de fermeture en caoutchouc, d'une microplaque de détection et d'un dispositif de fermeture en métal.



Préparation des microplaques de détection

1 Préparation de la solution mère indicatrice

- Ajouter 900 ml d'eau distillée dans un bécher de 1000ml.
- Placer ce bécher sur un agitateur magnétique et chauffer à 60°C. **Ne pas dépasser 65°C, sinon le rouge de crésol sera inutilisable**
- Placer des tips et des plaques ELISA dans une étuve à 60°C.
- Quand l'eau distillé a atteint 60°C, ajouter :
 - 18,75mg de crésol rouge
 - 16,77g de chlorure de potassium
 - 0,315g de bicarbonate
- Ajuster le volume à 1000 ml avec de l'eau distillée une fois que les 3 solutés sont dissous. **Stocker la solution mère à l'abris de la lumière dans de l'aluminium pendant 6 mois maximum.**

2 Préparation de la solution d'agar à 3%

- Ajouter 100ml d'eau distillée dans un bécher de 150-200ml.
- Ajouter 3g de poudre d'agar dans ce bécher.
- Chauffer la solution grâce a un agitateur magnétique réglé sur 100°C pendant 5-10 minutes, jusqu'à ce que la solution translucide.
- Transvaser la solution d'agar dans une bouteille en verre, faire refroidir la solution d'agar 3% obtenue en la laissant à l'air libre 1 à 2 minutes tout en la remuant.
- Placer la bouteille dans un bain-marie à 60°C.

3 Préparation de la solution de détection

- Combiner la solution mère et la solution d'agar 3% dans un ratio (1 :2) (agar : solution mère) à même température (60°C).

4 Préparation des microplaques de détection

- Préparer plusieurs microplaques en même temps car le taux de réussite n'est jamais de 100%.
- Déposer 150µl de solution de détection dans chaque puit. Éviter la formation de bulle dans le gel lors de l'insertion de la solution indicatrice dans les puits.
- Stocker les microplaques dans un dessiccateur fermé et à l'abri de la lumière. Placer un erlenmeyer rempli d'eau et un pot de cristaux de chaux sodée au fond du dessiccateur pour garder une atmosphère humide dans le dessiccateur tant qu'une microplaque y est conservée.
- Laisser les microplaques s'équilibrer pendant 2 jours avant utilisation.

Préparation et remplissage de la plaque à puits profonds

1 Lire absorbance de la microplaque

- A l'aide du spectromètre TECAN Spark, lire l'absorbance de la microplaque de détection.
- Vérifier le pourcentage de coefficient de variance (%CoV) afin de savoir si la microplaque est conforme et donc utilisable. (%CoV < 5%).
 - Formule : $\%CoV = (\text{écart-type}/\text{moyenne}) * 100$
- Sauvegarder les résultats du temps 0.
- Replacer la microplaque de détection dans le dessiccateur.

2 Remplissage de la plaque à puits profonds

- Tamiser le sol à 2mm.
- Insérer 150 µl d'eau distillé dans la première ligne des puits profonds comme témoin négatif.
- Remplir chaque colonne avec les 12 échantillons de sol tamisé. Peser la plaque à puits profonds après remplissage d'une colonne.
- Recouvrir la plaque à puits profonds avec le tapis de fermeture en caoutchouc.



- Sortir la microplaque de détection mesurée au préalable et l'emboîter sur le tapis de fermeture en caoutchouc. De sorte que le micropuit A1 corresponde au puit profond A12.



- Celer le tout à l'aide du dispositif en métal permettant d'assurer l'étanchéité du dispositif expérimental.



- Incuber le dispositif pendant 6h à température ambiante.
- Lire l'absorbance de la microplaque sur le spectromètre TECAN Spark et sauvegarder les résultats.
- Replacer la microplaque dans le dessiccateur. La microplaque de détection peut être réutiliser jusqu'à ce qu'elle sèche et que le %CoV reste plus petit que 5%.

Bibliographie

Campbell C.D., Chapman S.J., Cameron C.M., Davidson M.S. & Potts J.M., 2003. A Rapid Microtiter Plate Method To Measure Carbon Dioxide Evolved from Carbon Substrate Amendments so as To Determine the Physiological Profiles of Soil Microbial Communities by Using Whole Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(6), 3593–3599, DOI:10.1128/AEM.69.6.3593-3599.2003.

Rowell M.J., 1995. Colorimetric method for CO₂ measurement in soils. *Soil Biol. Biochem.* **27**(3), 373–375, DOI:10.1016/0038-0717(94)00218-P.

Science behind MicroResp™, 2019. . <https://www.microresp.com/science>, (09/02/2023).

5 Protocol – purification of DNA from soil and sediment

Before starting the preparation:

- Check Lysis Buffer SL1 or SL2 for precipitated SDS. Dissolve any precipitate by incubating the buffer at 30–40 °C for 10 min and shaking the bottle every 2 min.

1 Prepare sample

See section 2.4 and 2.5 for more information on the amount of starting material and the choice of lysis buffer. See section 2.7 for the repeated extraction of a sample to improve DNA yield.



250–500 mg
sample
+700 µL SL1
or SL2

Transfer **250–500 mg** fresh **sample material** to a **MN Bead Tube Type A** containing the ceramic beads.

Important: Do not fill the tube **higher** than the **1 mL mark**.

Add **700 µL Buffer SL1** or **Buffer SL2**.

Note for very dry material: If the sample material soaks up too much lysis buffer, fill the MN Bead Tube Type A up to the 1.5 mL mark with fresh lysis buffer.

Note for very wet material: Remove excess liquid before addition of lysis buffer, if necessary after spinning down the sample.

2 Adjust lysis conditions

Add **150 µL Enhancer SX** and close the cap.



+150 µL SX

Note: Enhancer SX ensures the highest possible DNA yield. It can, however, also promote the release of humic acids. See section 2.5 on how to lower the volume or omit the buffer entirely in order to increase DNA purity.

3 Sample lysis

See section 2.6 for more information on homogenization methods (e.g., FastPrep®-24 Instrument, Vortex adapter).



Vortex
RT, 5 min

Attach the MN Bead Tubes **horizontally** to a vortexer, for example, by taping or using a special adapter.

Vortex the samples at **full speed** and **room temperature** (18–25 °C) for **5 min**.

4 Precipitate contaminants

Centrifuge for **2 min** at **11,000 x g** to eliminate the foam caused by the detergent.

Note: The clear supernatant can be transferred to a new collection tube (not provided) prior to the following precipitation. This might result in more consistent yields from prep to prep and is highly recommended for carbonate containing samples. See also section 2.7 for repeated extraction of a sample to improve DNA yield.

Add **150 µL Buffer SL3** and vortex for **5 s**.

Incubate for **5 min** at **0–4 °C**.

Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**.



11,000 x g,
2 min

+150 µL SL3

Vortex 5 s

0–4 °C,
5 min



11,000 x g,
1 min

5 Filter lysate

Place a **NucleoSpin® Inhibitor Removal Column** (red ring) in a Collection Tube (2 mL, lid).

Load up to **700 µL** clear supernatant of step 4 onto the filter.

Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**.

Note: With very wet samples (e.g., sediments) the volume of clear supernatant of step 4 can exceed 700 µL significantly. In this case transfer the NucleoSpin® Inhibitor Removal Column to a new collection tube (not provided) and load the remaining supernatant. Centrifuge for 1 min at 11,000 x g. Combine the flow throughs.

Discard the NucleoSpin® Inhibitor Removal Column.

If a pellet is visible in the flow through, transfer the clear supernatant to a new collection tube (not provided).



Load
supernatant



11,000 x g,
1 min

6 Adjust binding conditions

Add **250 µL Buffer SB** and close the lid.

Vortex for **5 s**.

Note: If samples were stabilized in Zymo DNA/RNA Shield, quantify total sample volume after addition of Buffer SB and add 0.2 volumes of isopropanol.



+250 µL SB

Vortex 5 s

7 Bind DNA

Place a **NucleoSpin® Soil Column** (green ring) in a Collection Tube (2 mL).

Load **550 µL sample** onto the column.

Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**.

Discard flow through and place the column back into the collection tube.

Load the **remaining sample** onto the column.

Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**.

Discard flow through and place the column back into the collection tube.



Load **550 µL sample**

11,000 x g,
1 min



Load
remaining sample

11,000 x g,
1 min

Protocole qPCR

1 Dilution de l'ADN et des amorces

- Diluer l'ADN à une concentration 10ng/μL avec de l'eau pure. Le volume final est de 20μL.
- Diluer les amorces à 10 μM avec de l'eau pure. Le volume final est de 100 μL.
- Amorces pour le gène 16S :
 - 5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'
 - 5'-ATT ACC GCT GCT GGC A-3'
- Amorces pour le gène 18S :
 - 5'-AIC CAT TCA ATC GGT AIT-3'
 - 5'CGA TAA CGA ACG AGA CCT-3'.

2 Préparation du Master Mix (quantité/puits)

	Pour un échantillon (μL)	Pour x+2 échantillons (μL) (105)
H ₂ O sans nucléase	2	210
Primer Forward 16S ou 18S	1	105
Primer Reverse 16S ou 18S	1	105
GoTaq [®] qPCR Master Mix	5	525

Garder tous les contenants sur glace (H₂O, amorces, GoTaq[®])

3 Dilution des plasmides pour les courbes d'étalonnage

- Préparer plusieurs dilutions de plasmides dans des microtubes PCR, allant de 10⁸ à 10³ copies de plasmides. Le volume final de chaque dilution est de 10 μL.
- 6 gammes : 10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³

10 ⁸	1 μL de stock
10 ⁷	1 μL de 10 ⁸ + 9 μL H ₂ O
10 ⁶	1 μL de 10 ⁷ + 9 μL H ₂ O
10 ⁵	1 μL de 10 ⁶ + 9 μL H ₂ O
10 ⁴	1 μL de 10 ⁵ + 9 μL H ₂ O
10 ³	1 μL de 10 ⁴ + 9 μL H ₂ O

4 Préparation des plaques à 96 puits

Les plaques MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (ThermoFischer Ref N8010560) sont utilisées avec les films MicroAmp Optical Adhesive Film (ThermoFisher Ref 4311971). Le thermocycleur « BIO-RAD CFX96™ Real-Time System » est employé, ainsi que le logiciel CFX Manager software de Bio-Rad pour l'acquisition des résultats.

- Remplir les puits avec 9 µL de Master Mix. **Les déposer bien au fond du puit.**
- Ajouter 1 µL d'ADN (plasmide ou échantillon).
- Modèle de plaque :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	C_Ctrl_T1_1	C_Ctrl_T1_2	C_Ctrl_T1_3	C_Ctrl_T2_1	C_Ctrl_T2_2	C_Ctrl_T2_3	C_Ctrl_T3_1	C_Ctrl_T3_2	C_Ctrl_T3_3
B	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	C_0,1x_T1_1	C_0,1x_T1_2	C_0,1x_T1_3	C_0,1x_T2_1	C_0,1x_T2_2	C_0,1x_T2_3	C_0,1x_T3_1	C_0,1x_T3_2	C_0,1x_T3_3
C	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	C_1x_T1_1	C_1x_T1_2	C_1x_T1_3	C_1x_T2_1	C_1x_T2_2	C_1x_T2_3	C_1x_T3_1	C_1x_T3_2	C_1x_T3_3
D	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	C_10x_T1_1	C_10x_T1_2	C_10x_T1_3	C_10x_T2_1	C_10x_T2_2	C_10x_T2_3	C_10x_T3_1	C_10x_T3_2	C_10x_T3_3
E	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	F_Ctrl_T1_1	F_Ctrl_T1_2	F_Ctrl_T1_3	F_Ctrl_T2_1	F_Ctrl_T2_2	F_Ctrl_T2_3	F_Ctrl_T3_1	F_Ctrl_T3_2	F_Ctrl_T3_3
F	10 ³	10 ³	10 ³	F_0,1x_T1_1	F_0,1x_T1_2	F_0,1x_T1_3	F_0,1x_T2_1	F_0,1x_T2_2	F_0,1x_T2_3	F_0,1x_T3_1	F_0,1x_T3_2	F_0,1x_T3_3
G	H2O	H2O	H2O	F_1x_T1_1	F_1x_T1_2	F_1x_T1_3	F_1x_T2_1	F_1x_T2_2	F_1x_T2_3	F_1x_T3_1	F_1x_T3_2	F_1x_T3_3
H	H2O	H2O	H2O	F_10x_T1_1	F_10x_T1_2	F_10x_T1_3	F_10x_T2_1	F_10x_T2_2	F_10x_T2_3	F_10x_T3_1	F_10x_T3_2	F_10x_T3_3

Légendes :	
T1	3 jours
T2	3 semaines
T3	3 mois
F	Fuego
C	Carpatus

- Centrifuger la plaque à 400 rpm pendant 1 minute.
- Lancer le programme (identique pour 16S ou 18S).

Standard Cycling Conditions

Step	Cycles	Temperature	Time
GoTaq® Hot Start Polymerase activation	1	95°C	2 minutes
Denaturation	40	95°C	15 seconds
Annealing and extension		60°C	1 minute

Annexe 7 : Protocole de séquençage nanopore développé par Oxford Nanopore Technologies.

16S Barcoding Kit 1-24 (SQK-16S024)

Version: 16S_9086_v1_revM_14Aug2019
Last update: 21/04/2021



Flow Cell Number:

DNA Samples:

Before start checklist		
Materials	Consumables	Equipment
<input type="checkbox"/> 10 ng high molecular weight genomic DNA	<input type="checkbox"/> 1.5 ml Eppendorf DNA LoBind tubes	<input type="checkbox"/> Microfuge
<input type="checkbox"/> 16S Barcoding Kit 1-24 (SQK-16S024)	<input type="checkbox"/> 0.2 ml thin-walled PCR tubes	<input type="checkbox"/> Timer
<input type="checkbox"/> Flow Cell Priming Kit (EXP-FLP002)	<input type="checkbox"/> Nuclease-free water (e.g. ThermoFisher, cat # AM9937)	<input type="checkbox"/> Thermal cycler
	<input type="checkbox"/> Agencourt AMPure XP beads	<input type="checkbox"/> Pipettes and pipette tips P2, P10, P20, P100, P200, P1000
	<input type="checkbox"/> LongAmp Hot Start Taq 2X Master Mix (NEB, M0533S)	
	<input type="checkbox"/> Freshly prepared 70% ethanol in nuclease-free water	
	<input type="checkbox"/> 10 mM Tris-HCl pH 8.0 with 50 mM NaCl	
INSTRUCTIONS		NOTES/OBSERVATIONS

INSTRUCTIONS
Library preparation
<input type="checkbox"/> Take one 96-well plate containing 16S barcodes. Break one set of barcodes (1-24, or as desired) away from the plate and return the rest to storage.
IMPORTANT
<input type="checkbox"/> The 96-well plates are designed to break in one direction only. Strips, or multiple strips, of eight wells/barcodes can be removed from the plate at any one time.
<input type="checkbox"/> Thaw the desired barcodes, make sure the liquid is at the bottom of the tubes, and place on ice.
<input type="checkbox"/> Thaw the LongAmp Hot Start Taq 2X Master Mix, spin down briefly, mix well by pipetting and place on ice.
Prepare the DNA in Nuclease-free water.
<input type="checkbox"/> Transfer 10 ng genomic DNA into a DNA LoBind tube
<input type="checkbox"/> Adjust the volume to 10 µl with Nuclease-free water
<input type="checkbox"/> Mix thoroughly by flicking the tube, to avoid unwanted shearing
<input type="checkbox"/> Spin down briefly in a microfuge
For each sample to be tested, prepare the following mixture in separate 0.2 ml thin-walled PCR tubes.
<input type="checkbox"/> 5 µl Nuclease-free water
<input type="checkbox"/> 10 µl Input DNA (10 ng)
<input type="checkbox"/> 25 µl LongAmp Hot Start Taq 2X Master Mix
<input type="checkbox"/> Mix gently by flicking the tube, and spin down.
<input type="checkbox"/> Using clean pipette tips, carefully pierce the foil surface of the required barcodes. Use a new tip for each barcode to avoid cross-contamination. Make a note of which barcode numbers will be run for each sample.

INSTRUCTIONS

Using a multichannel pipette, mix the 16S barcodes by pipetting up and down 10 times. Transfer 10 μ l of each 16S Barcode into respective sample-containing tubes.

Mix thoroughly by pipetting up and down ten times.

Amplify using the following cycling conditions:

Initial denaturation 1 min @ 95 °C (1 cycle)

Denaturation 20 secs @ 95 °C (25 cycles)

Annealing 30 secs @ 55 °C (25 cycles)

Extension 2 mins @ 65 °C (25 cycles)

Final extension 5 mins @ 65 °C (1 cycle)

Hold @ 4 °C

Transfer each sample to a separate 1.5 ml DNA LoBind Eppendorf tube. Carry out steps 11-21 for each sample, before pooling the samples at step 22.

Resuspend the AMPure XP beads by vortexing.

Add 30 μ l of resuspended AMPure XP beads to the reaction and mix by pipetting.

Incubate on a Hula mixer (rotator mixer) for 5 minutes at RT.

Prepare 500 μ l of fresh 70% ethanol in Nuclease-free water.

Spin down the sample and pellet on a magnet. Keep the tube on the magnet, and pipette off the supernatant.

Keep the tube on the magnet and wash the beads with 200 μ l of freshly prepared 70% ethanol without disturbing the pellet. Remove the ethanol using a pipette and discard.

Repeat the previous step.

Spin down and place the tube back on the magnet. Pipette off any residual ethanol. Allow to dry for ~30 seconds, but do not dry the pellet to the point of cracking.

Remove the tube from the magnetic rack and resuspend pellet in 10 μ l of 10 mM Tris-HCl pH 8.0 with 50 mM NaCl. Incubate for 2 minutes at RT.

Pellet the beads on a magnet until the eluate is clear and colourless.

Remove and retain 10 μ l of eluate into a clean 1.5 ml Eppendorf DNA LoBind tube.

Remove and retain the eluate which contains the DNA in a clean 1.5 ml Eppendorf DNA LoBind tube

Dispose of the pelleted beads

Quantify 1 μ l of eluted sample using a Qubit fluorometer.

Pool all barcoded libraries in the desired ratios to a total of 50-100 fmoles in 10 μ l of 10 mM Tris-HCl pH 8.0 with 50 mM NaCl. For 16S amplicons of ~1500 bp, 50-100 fmoles equates to ~50-100 ng.

Add 1 μ l of RAP to the barcoded DNA.

Mix gently by flicking the tube, and spin down.

INSTRUCTIONS

- Incubate the reaction for 5 minutes at RT.

The prepared library is used for loading into the MinION flow cell. Store the library on ice until ready to load.

Priming and loading the SpotON flow cell

IMPORTANT

- Please note that the Sequencing Tether (SQT) tube will NOT be used in this protocol. It is provided in the kit for potential future product compatibility.

- Thaw the Sequencing Buffer (SQB), Loading Beads (LB), Flush Tether (FLT) and one tube of Flush Buffer (FB) at RT.
- Mix the Sequencing Buffer (SQB), Flush Tether (FLT) and Flush Buffer (FB) tubes by vortexing and spin down at RT.
- Open the MinION Mk1B lid and slide the flow cell under the clip.
- Slide the priming port cover clockwise to open the priming port.

IMPORTANT

- Take care when drawing back buffer from the flow cell. Do not remove more than 20-30 μl , and make sure that the array of pores are covered by buffer at all times. Introducing air bubbles into the array can irreversibly damage pores.

After opening the priming port, check for a small air bubble under the cover. Draw back a small volume to remove any bubbles (a few μl):

- Set a P1000 pipette to 200 μl
- Insert the tip into the priming port
- Turn the wheel until the dial shows 220-230 μl , or until you can see a small volume of buffer entering the pipette tip
- To prepare the flow cell priming mix, add 30 μl of thawed and mixed Flush Tether (FLT) directly to the tube of thawed and mixed Flush Buffer (FB), and mix by vortexing at RT.
- Load 800 μl of the priming mix into the flow cell via the priming port, avoiding the introduction of air bubbles. Wait for 5 minutes. During this time, prepare the library for loading by following the steps below.
- Thoroughly mix the contents of the Loading Beads (LB) tubes by vortexing.

IMPORTANT

- The Loading Beads (LB) tube contains a suspension of beads. These beads settle very quickly. It is vital that they are mixed immediately before use.

In a new tube, prepare the library for loading as follows:

- 34 μl Sequencing Buffer (SQB)
- 25.5 μl Loading Beads (LB), mixed immediately before use
- 4.5 μl Nuclease-free water
- 11 μl DNA library

INSTRUCTIONS

Complete the flow cell priming:

- Gently lift the SpotON sample port cover to make the SpotON sample port accessible.
- Load 200 μ l of the priming mix into the flow cell via the priming port (not the SpotON sample port), avoiding the introduction of air bubbles.
- Mix the prepared library gently by pipetting up and down just prior to loading.
- Add 75 μ l of sample to the flow cell via the SpotON sample port in a dropwise fashion. Ensure each drop flows into the port before adding the next.
- Gently replace the SpotON sample port cover, making sure the bung enters the SpotON port, close the priming port and replace the MinION Mk1B lid.

Ending the experiment

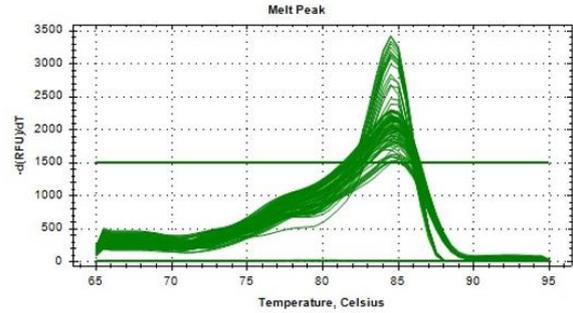
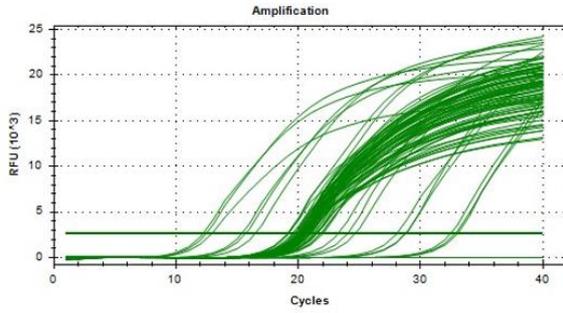
- After your sequencing experiment is complete, if you would like to reuse the flow cell, please follow the Wash Kit instructions and store the washed flow cell at 2-8°C, OR
- Follow the returns procedure by washing out the flow cell ready to send back to Oxford Nanopore.

IMPORTANT

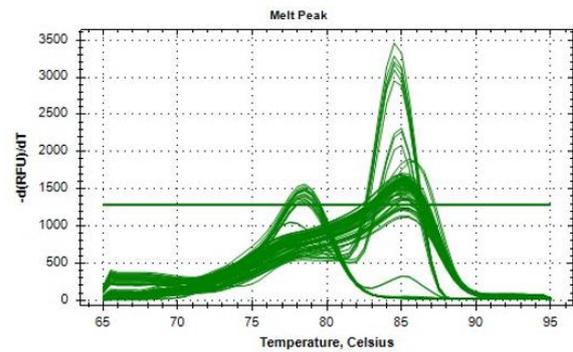
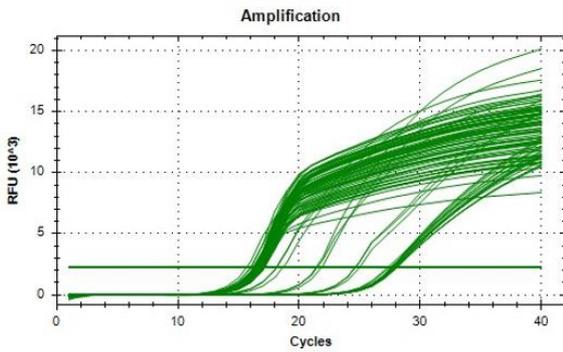
- If you encounter issues or have questions about your sequencing experiment, please refer to the Troubleshooting Guide that can be found in the online version of this protocol.

Annexe 8: Résultats de la q-PCR

18S



16S



Annexe 9: Fonction dans le sol et l'eau des genres bactériens enrichis et appauvris à la dose 10x et 1x par rapport à la dose contrôle.

		Dose 10x/Contrôle
	Genre bactérien	Fonctions dans le sol/ l'eau
Enrichis	<i>OM60(NOR5) clade (f: Haliaceae)</i>	Joue un rôle important dans la réponse aux efflorescences phytoplanctoniques (Li et al., 2023).
	<i>Desulfobacterium</i>	Capable de réaliser la réduction dissimilatoire du sulfate. Il joue des rôles positifs en participant à la bioremédiation des hydrocarbures et des métaux toxiques, ainsi qu'à la récupération des métaux précieux. Cependant, il a aussi des effets négatifs, notamment la biocorrosion des infrastructures pétrolières et une possible association avec des maladies humaines telles que l'autisme et les maladies inflammatoires de l'intestin (Lobo et al., 2012).
	<i>SWB02 (f: Hyphomonadaceae)</i>	Certaines espèces sont capable de dénitrification (Abraham et al., 2014).
	<i>Sideroxydans</i>	Capable d'oxyder le Fer (II) (Zhou et al., 2022).
	<i>env.OPS_17 (o: Sphingobacteriales)</i>	Deux familles dominantes dans cet ordre : les Sphingobacteriaceae, qui sont des indicateurs potentiels des stades avancés de décomposition ; les Chitinophagaceae, qui ont des capacités fermentatives limitées des hydrates de carbone et la possession de ménaquinones MK-7, ce qui suggère leur rôle dans la décomposition de matières organiques complexes (Olakanye et al., 2018).
Appauvris	<i>Blastocatella</i>	/
	<i>Kaistia</i>	/
	<i>Uncultured (f: Roseiflexaceae)</i>	/

		Dose 1x/Contrôle
	Genre bactérien/famille	Fonctions dans le sol/ l'eau
Enrichis	<i>Candidatus_Udaeobacter</i> (f: <i>Chthoniobacteraceae</i>)	Contribue au cycle global de l'hydrogène en utilisant H ₂ (Willms et al., 2020).
	<i>Uncultured</i> (f: <i>Beggiatoaceae</i>)	Capacité à oxyder le sulfure en soufre élémentaire, stocké sous forme de globules de soufre intracellulaires (Teske et al., 2014).
Appauvris	<i>37-13</i> (f: <i>Chitinophagales</i>)	/
	<i>IMCC26134</i> (f: <i>Opitutaceae</i>)	/
	<i>Comamonas</i>	Principalement associés à la bioremédiation environnementale (Ryan et al., 2022).
	<i>Haliangium</i>	/
	<i>Blastocatellaceae</i>	/
	<i>Armatimonadales</i>	/
	<i>WS2</i>	/
	<i>Lineage_Iia</i>	/
	<i>Luteitalea</i>	/
	<i>Promicromonospora</i>	/
	<i>Nitratireductor</i>	Joue un rôle dans la réduction du nitrate (Labbé et al., 2004).
	<i>Cytophaga</i>	Capacité à utiliser et décomposer la matière organique dissoute de haute masse moléculaire dans les environnements aquatiques (Kirchman, 2002).
	<i>Variovorax</i>	Capable de stocker de l'acide poly(3-hydroxybutyrique) comme source de carbone intracellulaire (Satola et al., 2013).
	<i>NS11</i>	/
	<i>Uncultured</i> (f: <i>Rhodanobacteraceae</i>)	/
	<i>Uncultured</i> (f: <i>Saprospiraceae</i>)	Capacité d'hydrolyse et d'utilisation de sources de carbone complexe et joue probablement un rôle important dans la décomposition de composés organiques complexes dans l'environnement (McIlroy et al., 2014).
	<i>Ferruginibacter</i>	/
	<i>Saccharimonadales</i>	Améliore l'activité de la phosphatase alcaline dans la rhizosphère (Wang et al., 2022).
<i>Dinghuibacter</i>	/	
<i>Aminobacter</i>	Possèdent des gènes impliqués dans la dégradation des phosphonates via la voie de la C-P lyase (Artuso et al., 2021).	
<i>FCPU426</i>	/	

<i>Stenotrophobacter</i>	/
<i>Puia</i>	/
<i>Actinoplanes</i>	Pourrait avoir des capacités de dégradation de tout type de matière biologique (Vobis et al., 2015).
<i>AKIW781</i>	/
<i>Limnobacter</i>	/
<i>Fluviicola</i>	/
<i>Bacteroidetes_VC2.1_Bac22</i>	Associés à la minéralisation du carbone organique complexe (Aires et al., 2024)
<i>LiUU-11-161</i>	/
<i>Caenimonas</i>	/
<i>Aurantisolimonas</i>	/

Légende :

/ = pas de fonctions spécifiques dans le sol ou dans l'eau, ou pas d'informations

