

Développement d'indicateurs microbiens pour l'évaluation de l'impact des herbicides FUEGO® (metazachlore) et CARPATUS® (diflufenican, flufenacet) sur les communautés microbiennes du sol

Auteur : Denoël, Shannah

Promoteur(s) : De Clerck, Caroline; 24722

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

Diplôme : Master en bioingénieur : sciences agronomiques, à finalité spécialisée

Année académique : 2023-2024

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/21272>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

**DÉVELOPPEMENT D'INDICATEURS
MICROBIENS POUR L'ÉVALUATION DE
L'IMPACT DES HERBICIDES FUEGO®
(METAZACHLORE) ET CARPATUS®
(DIFLUFENICAN, FLUFENACET) SUR LES
COMMUNAUTÉS MICROBIENNES DU SOL**

DENOËL SHANNAH

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE MASTER
BIOINGÉNIEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

ANNÉE ACADÉMIQUE 2023-2024

CO-PROMOTEURS : DE CLERCK CAROLINE – COPPINE JÉRÔME

©Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de Gembloux Agro-Bio Tech.

Le présent document n'engage que son auteur.

**DÉVELOPPEMENT D'INDICATEURS
MICROBIENS POUR L'ÉVALUATION DE
L'IMPACT DES HERBICIDES FUEGO®
(METAZACHLORE) ET CARPATUS®
(DIFLUFENICAN, FLUFENACET) SUR LES
COMMUNAUTÉS MICROBIENNES DU SOL**

DENOËL SHANNAH

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE MASTER
BIOINGÉNIEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

ANNÉE ACADÉMIQUE 2023-2024

CO-PROMOTEURS : DE CLERCK CAROLINE – COPPINE JÉRÔME

Remerciements

Je tiens à commencer les traditionnels remerciements pour Caroline De Clerk et Jérôme Coppine, mes deux promoteurs. Merci pour leur suivi exceptionnel, leur bienveillance, leurs encouragements et leurs précieux conseils qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je tiens également à remercier les différents instituts qui m'ont permis d'intégrer le projet MICROSENSE. Je pense tout d'abord au CRA-W mais aussi aux laboratoires à la Quintinie, où j'ai pu réaliser une partie de mes expérimentations, avec une attention particulière à Benjamin Dubois, pour son aide précieuse dans mes analyses bioinformatiques. Je remercie également le CEBEDEAU, et tout particulièrement Gilles Quabron, pour sa précieuse aide et son investissement dans ce projet.

Je remercie évidemment les professeurs et chercheurs qui m'ont aidé tout au long de ce TFE : Yves Brostaux pour ses recommandations en statistique ; et Jimmy, Adrien et Macha pour leurs conseils en laboratoire.

Je souhaite adresser un grand MERCI à tous les amis que je me suis faits à Gembloux et qui font maintenant partie intégrante de ma vie : les Girlz de Gembled ; Alicia ma jumelle (team 9/11 forever), le kot Combattant avec une pensée particulière à maman Loli, qui m'aura aidée dans ce TFE et est une amie extraordinaire ; Joanna, ma coéquipière et amie de toujours, qui a rendu mes années de kot inoubliables ; mes Bruxelloises préférées, Virginie et Luna, qui complètent les deux amitiés qui me manquaient dans mon cœur ; Claire, qui a été d'un soutien inconditionnel et a embelli ma dernière année de kot à La Douille ; Tom, pour ses précieux conseils ; et finalement, à l'open space des TFistes, et tout particulièrement Valentine, sur qui j'ai pu compter lors de la dernière ligne droite ! #TeamCaféLait

Je tiens également à remercier ma meilleure amie, Estelle. Merci de m'avoir écoutée, soutenue dans mes pleurs, mes joies, mes histoires !

Je remercie aussi toute ma famille que j'aime plus que tout, et particulièrement mes parents pour leur soutien à toute épreuve, sans qui je n'aurais pas pu effectuer ces études aujourd'hui.

Enfin, merci à ces vieux murs de Gembloux qui m'ont fait grandir, évoluer et surtout, m'ont fait rencontrer le plus grand pilier de ma vie. Merci à ma personne préférée sur terre, Quentin, pour m'avoir soutenue et d'avoir cru en moi tout au long de ce travail.

Résumé

La croissance démographique mondiale accroît la demande alimentaire, nécessitant des systèmes agroalimentaires plus productifs et durables. L'utilisation de produits phytosanitaires, bien qu'essentielle pour maintenir les rendements, pose des risques pour l'environnement et particulièrement pour les écosystèmes du sol. Cette étude évalue les impacts de deux herbicides, FUEGO® et CARPATUS®, sur les communautés microbiennes du sol, dans le but de développer un outil de diagnostic environnemental accessible et efficace pour détecter la présence de pesticides et de leurs métabolites dans les sols et les eaux. L'expérience, réalisée en microcosmes contrôlés en laboratoire, a testé plusieurs doses d'herbicides (0,1x, 1x, 10x la dose agronomique de référence et un contrôle) à quatre temporalités (3 heures, 3 jours, 3 semaines et 3 mois). Les impacts ont été évalués par des mesures de l'activité enzymatique FDA, de la respiration microbienne par MicroResp™, et de l'abondance et de la diversité microbienne via q-PCR et Metabarcoding 16S. Les résultats montrent que, dans les conditions testées, les herbicides étudiés n'ont pas d'impact négatif marquant sur les microorganismes du sol et sur les communautés bactériennes. Ils montrent même que l'ajout de ces herbicides pourrait servir de source de carbone ou d'énergie pour les microorganismes, augmentant ainsi leur nombre et leur activité dans le sol. Bien qu'aucun bioindicateur clair n'ait été identifié lors de ce travail, des perspectives concrètes sont proposées pour évaluer l'impact des herbicides dans le sol, non par un bioindicateur unique tel qu'une fonction, un gène ou une espèce bactérienne spécifique, mais plutôt avec un ensemble d'indicateurs comprenant entre autres des activités enzymatiques répondant à l'ajout d'herbicides dans le sol.

Mots clés : herbicide, écotoxicologie, FUEGO®, CARPATUS®, communauté microbienne

Abstract

Global population growth is increasing demand for food, requiring more productive and sustainable agri-food systems. The use of phytosanitary products, while essential for maintaining yields, poses risks for the environment and in particular to soil ecosystems. This study aims to evaluate the impact of two herbicides, FUEGO[®] and CARPATUS[®], on soil microbial communities, with the aim of developing an accessible and effective environmental diagnostic tool to detect the presence of pesticides and their metabolites in soils and waters. The experiment, conducted in controlled laboratory microcosms, tested several herbicide doses (0.1x, 1x, 10x the agronomic reference dose and a control) at four-time scales (3 hours, 3 days, 3 weeks and 3 months). Impacts were assessed by measuring FDA enzyme activity, microbial respiration using MicroResp[™], microbial abundance via q-PCR and diversity by Metabarcoding 16S. The results show that, under the tested conditions, the herbicides studied do not have a significant negative impact on soil microorganisms or bacterial communities. In fact, they suggest that the addition of these herbicides could serve as a carbon or energy source for microorganisms, thereby increasing their number and activity in the soil. Although no clear bioindicator was identified in this study, concrete perspectives are proposed for assessing the impact of herbicides in soil. Rather than relying on a single bioindicator, such as a function, gene, or specific bacterial species, a more comprehensive approach involving a set of indicators, including specific enzymatic activities responsive to herbicide addition, is recommended.

Keywords: herbicide, ecotoxicology, FUEGO[®], CARPATUS[®], microbial community

Table des matières

1	Introduction	1
2	État de l'art.....	3
2.1	Destin des pesticides dans l'environnement.....	3
2.1.1	Répartition initiale des pesticides.....	3
2.1.2	Persistence et rétention dans le sol.....	4
2.1.3	Dégradation des pesticides dans le sol	5
2.2	Problématique des pesticides dans l'environnement et leurs impacts sur les microorganismes du sol	6
2.3	Herbicides problématiques dans l'environnement.....	8
2.3.1	FUEGO® (Métazachlore).....	8
2.3.2	CARPATUS®	9
2.4	Rôle crucial de la qualité et de la santé des sols	11
2.4.1	Qualité et santé d'un sol	11
2.4.2	Impact des populations microbiennes sur la qualité des sols.....	11
2.5	Nécessité de disposer d'indicateurs pour évaluer la qualité des sols.....	12
2.5.1	Indicateurs chimiques	13
2.5.2	Indicateurs physiques	13
2.5.3	Indicateurs microbiens.....	13
3	Matériel et méthodes.....	15
3.1	Herbicides.....	15
3.2	Dispositif expérimental	15
3.2.1	Prélèvement de sol.....	16
3.2.2	Mise en place des microcosmes	17
3.3	Étude de l'activité microbienne par analyse de l'activité enzymatique par fluorescence.....	18

3.4	Étude de la respiration microbienne par Microresp TM	19
3.5	Étude de la biomasse microbienne et de la structure des communautés bactériennes 20	
3.5.1	Extraction d'ADN	20
3.5.2	Étude de la biomasse microbienne par quantification des bactéries et des champignons par q-PCR	21
3.5.3	Séquençage et traitement des données de séquençage Nanopore metabarcoding 22	
3.6	Analyses statistiques	24
3.6.1	RStudio®	24
3.6.2	QUIIME2	25
4	Résultats	26
4.1	Effet des herbicides FUEGO® et CARPATUS® sur l'activité, la respiration et la biomasse microbienne.....	26
4.1.1	Activité microbienne	26
4.1.2	Respiration microbienne.....	30
4.1.3	Biomasse microbienne.....	34
4.2	Effet des herbicides FUEGO® et CARPATUS® sur les communautés bactériennes	39
4.2.1	FUEGO®	40
4.2.2	CARPATUS®	43
5	Discussion	50
5.1	Effet de l'application de l'herbicide FUEGO® sur l'activité, la respiration et la biomasse microbienne ainsi que sur les communautés bactériennes	50
5.2	Effet de l'application de l'herbicide CARPATUS® sur l'activité, la respiration et la biomasse microbienne ainsi que sur les communautés bactériennes	53
5.3	Mise au point d'un outil de diagnostic	56
6	Contribution personnelle.....	58
7	Conclusions et perspectives	59

8	Bibliographie	61
9	Annexes.....	72

Table des figures

Figure 1: Destin des pesticides dans le sol (Koçak, 2023)	6
Figure 2: Réponse de l'écosystème du sol face aux perturbations, influencée par la résistance et la résilience de la communauté microbienne du sol (Griffiths et al., 2013). © 2013 Fédération des sociétés européennes de microbiologie	12
Figure 3: Plan expérimental des microcosmes pour un herbicide étudié.	16
Figure 4: Photo satellite de la localisation de la parcelle de prélèvement des échantillons (WalOnMap).	17
Figure 5: Schéma d'un puits profond relié à un puits de détection, montrant la position et la composition du système de détection de colorants (Campbell et al., 2003).	19
Figure 6: Extraction d'ADN (1= homogénéisation par billes de céramique ; 2 = Filtration du lysat ; 3 = Liaison de l'ADN sur la membrane de silice ; 4 = Lavage de la membrane de silice ; 5 = Elution de l'ADN) (Adapté de ("NucleoSpin Soil, Mini kit for DNA from soil," March-18-2024))	20
Figure 7: Le dispositif de séquençage MinION. Reprinted from «MinION Sequencer Internal Structure », by BioRender.com (2024). Retrieved from https://app.biorender.com/biorender-templates	23
Figure 8: Effet de la temporalité à chaque dose de FUEGO® appliquée sur l'activité enzymatique de la FDA. Des lettres différentes indiquent une différence significative (p-valeur < 0,05) entre les moyennes d'activité enzymatique pour les différentes temporalités, selon le test de Tukey. Les points de couleur représentent la dispersion des échantillons et les points noirs représentent les moyennes.	27
Figure 9: Effet de la dose de FUEGO® appliquée à chaque temporalité sur l'activité enzymatique de la FDA. Des lettres différentes indiquent une différence significative (p-valeur < 0,05) entre les moyennes d'activité enzymatique pour les différentes doses, selon le test de Tukey. Les points de couleur représentent la dispersion des échantillons et les points noirs représentent les moyennes.	28
Figure 10: Effet de la temporalité, toutes doses de CARPATUS® appliquée confondues, sur l'activité enzymatique de la FDA. Des lettres différentes indiquent une différence significative (p-valeur < 0,05) entre les moyennes d'activité enzymatique pour les différentes temporalités, selon un test de post hoc utilisant le critère de la plus petite différence significative de Fisher avec comme méthode d'ajustement la correction de Bonferroni. Les points de couleur représentent la dispersion des échantillons et les points noirs représentent les moyennes.	29

Figure 11: Effet de la dose de FUEGO® appliquée à chaque temporalité sur le taux d'émission de CO ₂ . Des lettres différentes indiquent une différence significative (p-valeur < 0,05) entre les moyennes des taux de CO ₂ émis pour les différentes doses, selon le test de Tukey. Les points de couleur représentent la dispersion des échantillons et les points noirs représentent les moyennes.	30
Figure 12: Effet de la temporalité à chaque dose de FUEGO® appliquée sur le taux d'émission de CO ₂ . Des lettres différentes indiquent une différence significative (p-valeur < 0,05) entre les moyennes des taux de CO ₂ émis pour les différentes temporalités, selon le test de Tukey. Les points de couleur représentent la dispersion des échantillons et les points noirs représentent les moyennes.	31
Figure 13: Effet de la dose de CARPATUS® appliquée à chaque temporalité sur le taux d'émission de CO ₂ . Des lettres différentes indiquent une différence significative (p-valeur < 0,05) entre les moyennes des taux de CO ₂ émis pour les différentes doses, selon le test de Tukey. Les points de couleur représentent la dispersion des échantillons et les points noirs représentent les moyennes.	32
Figure 14: Effet de la temporalité à chaque dose de CARPATUS® appliquée sur le taux d'émission de CO ₂ . Des lettres différentes indiquent une différence significative (p-valeur < 0,05) entre les moyennes des taux de CO ₂ émis pour les différentes temporalités, selon le test de Tukey. Les points de couleur représentent la dispersion des échantillons et les points noirs représentent les moyennes.	33
Figure 15: Effet de la dose de FUEGO® appliquée à chaque temporalité sur le nombre de gènes fongiques (18S). Des lettres différentes indiquent une différence significative (p-valeur < 0,05) entre les moyennes des nombres de gènes fongiques pour les différentes doses, selon le test de Tukey. Les points de couleur représentent la dispersion des échantillons et les points noirs représentent les moyennes	34
Figure 16: Effet de la temporalité à chaque dose de FUEGO® appliquée sur le nombre de gènes fongiques (18S). Des lettres différentes indiquent une différence significative (p-valeur < 0,05) entre les moyennes des nombres de gènes fongiques pour les différentes temporalités, selon le test de Tukey. Les points de couleur représentent la dispersion des échantillons et les points noirs représentent les moyennes.....	35
Figure 17: Effet de la dose de CARPATUS® appliquée à chaque temporalité sur le nombre de gènes fongiques (18S). Des lettres différentes indiquent une différence significative (p-valeur < 0,05) entre les moyennes des nombres de gènes fongiques pour les différentes doses, selon le	

test de Tukey. Les points de couleur représentent la dispersion des échantillons et les points noirs représentent les moyennes.....	36
Figure 18: Effet de la temporalité à chaque dose de CARPATUS® appliquée sur le nombre de gènes fongiques (18S). Des lettres différentes indiquent une différence significative (p-valeur < 0,05) entre les moyennes des nombres de gènes fongiques pour les différentes temporalités, selon le test de Tukey. Les points de couleur représentent la dispersion des échantillons et les points noirs représentent les moyennes.	37
Figure 19: Effet de la dose de CARPATUS® appliquée, toutes temporalités confondues, sur le nombre de gènes bactériens (16S). Des lettres différentes indiquent une différence significative (p-valeur < 0,05) entre les moyennes des nombres de gènes bactériens pour les différentes doses, selon un test de post hoc utilisant le critère de la plus petite différence significative de Fisher avec comme méthode d'ajustement la correction de Bonferroni. Les points de couleur représentent la dispersion des échantillons et les points noirs représentent les moyennes	38
Figure 20: Interprétation de la qualité des séquences d'ADN pour les herbicides FUEGO® et CARPATUS®, montrant la relation entre la longueur des reads et leur qualité moyenne.	39
Figure 21: Bar plot des fréquences relatives des genres bactériens de chaque échantillon de l'herbicide FUEGO® aux temporalités 2 et 3.	41
Figure 22: Légende des bar plot des fréquences relatives des genres bactériens de chaque échantillon de l'herbicide FUEGO® aux temporalités 2 et 3.	42
Figure 23: Bar plot des fréquences relatives des genres bactériens de chaque échantillon de l'herbicide CARPATUS® aux temporalités 2 et 3.....	44
Figure 24: Légende des bar plot des fréquences relatives des genres bactériens de chaque échantillon de l'herbicide CARPATUS® aux temporalités 2 et 3.	45
Figure 25: Box plot des indices de diversité alpha bactérienne pour l'herbicide CARPATUS® à la temporalité 3, comparant la dose 10x à la dose témoin. Les indices de diversité sont : 1 = Shannon, 2 = Observed Features, 3 = Faith PD (Carpatus10 = dose 10x, Control_carp = dose contrôle).	47
Figure 26: Box plot de l'indice de diversité alpha Faith PD bactérienne pour l'herbicide CARPATUS® à la temporalité 2, comparant la dose 1x à la dose témoin (Carpatus1 = dose 1x, Control_carp = dose contrôle).	47
Figure 27: Genres bactériens enrichis ou appauvris dans les échantillons traités avec la dose 10x par rapport à ceux de la dose contrôle.	48
Figure 28: Genres bactériens enrichis ou appauvris dans les échantillons traités avec la dose 1x par rapport à ceux de la dose contrôle.	49

Table des tableaux

Tableau 1: Indicateurs clés pour l'évaluation de la qualité des sols (d'après (Arshad et al., 2002))	
.....	13
Tableau 2: p-valeur de l'analyse de la diversité alpha et bêta, pour l'herbicide FUEGO® à chaque dose de chaque temporalité, comparée à la dose contrôle. Une p-valeur < 0,05 indique une différence significative.	43
Tableau 3: p-valeur de l'analyse de la diversité alpha et bêta, pour l'herbicide CARPATUS® à chaque dose de chaque temporalité, comparée à la dose contrôle. Une p-valeur < 0,5 indique une différence significative.	46

Table des annexes

Annexe 1: Protocole de mise en place des microcosmes pour l'herbicide FUEGO®	72
Annexe 2: Protocole de mise en place des microcosmes pour l'herbicide CARPATUS®	74
Annexe 3: Protocole du test d'activité enzymatique avec FDA et droite de calibration	76
Annexe 4: Protocole MicroResp™	79
Annexe 5: Protocole d'extraction d'ADN ("NucleoSpin Soil, Mini kit for DNA from soil", March-18-2024).	82
Annexe 6 : Protocole de quantification des populations bactériennes et fongiques par qPCR	85
Annexe 7 : Protocole de séquençage nanopore développé par Oxford Nanopore Technologies.	87
Annexe 8: Résultats de la q-PCR	91
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.	92

1 Introduction

La population mondiale est en constante croissance et est estimée passer de 8 milliards de personnes aujourd'hui à une projection de 9,8 milliards d'ici 2050 (Gouel et al., 2017). Il devient impératif de répondre à l'augmentation de la demande alimentaire pour cette population future. Les systèmes agroalimentaires apparaissent comme un levier crucial pour répondre à cette nécessité, en fournissant non seulement des denrées alimentaires à la société actuelle, mais également en créant des emplois pour plus d'un milliard de personnes (FAO, 2023). Pour satisfaire la demande actuelle en alimentation et anticiper celle de demain, une transition vers des systèmes agricoles plus productifs, écologiques et durables s'impose (FAO, 2017).

L'augmentation de la production agricole mondiale ne corrèle pas avec l'augmentation de la superficie agricole disponible. Alors que la production a plus que doublé, la superficie arable productive n'a augmenté que de 10% (Köhler et al., 2013). Dans ce contexte, l'utilisation de produits phytosanitaires (herbicides, insecticides et fongicides) est devenue essentielle pour contrôler les ravageurs tels que les adventices, les insectes et les agents pathogènes, assurant ainsi des rendements agricoles importants (Thiour-Mauprivez et al., 2019).

Toutefois, l'utilisation excessive de pesticides contamine inévitablement les sols, constituant ainsi une menace majeure pour les organismes vivant dans ces écosystèmes (Thiour-Mauprivez et al., 2019). L'idéal serait que les pesticides appliqués soient hautement sélectifs, possédant un spectre d'action limité aux organismes cibles, qu'ils soient biodégradables et ne contaminent pas les eaux souterraines (Johnsen et al., 2001). Cependant, il est rare que ces conditions soient réunies dans la pratique. Les évaluations approfondies effectuées par l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) avant la mise sur le marché des pesticides se concentrent exclusivement sur l'écotoxicité de ces produits pour les microorganismes du sol, en estimant l'impact de la substance active sur la minéralisation du carbone et de l'azote (Thiour-Mauprivez et al., 2019). Pourtant, selon Johnsen et al. (2001), l'application de pesticides peut considérablement modifier la structure des communautés microbiennes du sol, même si le métabolisme global de l'azote semble inchangé. Certains microorganismes peuvent être totalement supprimés tandis que d'autres prolifèrent, entraînant des modifications dans la communauté microbienne et ses activités ultérieures. Plus récemment, l'EFSA a mis en lumière la nécessité de redéfinir de nouveaux objectifs pour mieux préserver les services écosystémiques du sol. Cela implique d'identifier les organismes non-cibles comme des

éléments clés à protéger au sein des groupes fonctionnels (EFSA, 2010; Thiour-Mauprivez et al., 2019).

Ce mémoire s'inscrit dans le cadre du projet MICROSENSE, une collaboration entre le CEBEDEAU et le CRA-W, respectivement un centre de recherche et d'expertise pour l'eau et le centre de recherche agronomique en Wallonie. Ces deux entités unissent leurs compétences pour concevoir un outil de diagnostic environnemental reposant sur des principes simples d'utilisation, sans nécessiter de structure de laboratoire ou d'équipement spécifique. Ce projet vise à développer un outil dynamique et fonctionnel permettant d'analyser la dynamique et le fonctionnement des communautés microbiennes dans les échantillons environnementaux, tout en étant rapide, économique, et accessible à tous (CRA-W. | Centre wallon de Recherches, May-15-2024). Cet outil pourrait être utilisé par différents acteurs, tels que les agriculteurs envisageant une transition vers l'agriculture biologique, les organismes de contrôle environnemental (tels que Requasud, l'AFSCA, l'ISSEP, etc.), les particuliers souhaitant évaluer la qualité de leur sol, ainsi que toute autre personne ou organisation intéressée. La conception de ce système reste à définir, car il est nécessaire d'identifier et de valider les biomarqueurs au préalable.

Ce mémoire contribue à l'avancement du projet à travers deux objectifs. Premièrement, il vise à évaluer les impacts de deux herbicides environnementalement problématiques, FUEGO® (métazachlore) et le CARPATUS® (flufénacet et diflufenican), sur les communautés microbiennes. Deuxièmement, il cherche à identifier des biomarqueurs attestant de la présence de ces herbicides. De manière plus large, ce mémoire peut contribuer à l'atteinte des objectifs de l'EFSA, qui cherche à intégrer de nouveaux outils microbiens pour l'évaluation des risques environnementaux, en tenant compte de l'aspect écotoxicologique du sol (Thiour-Mauprivez et al., 2019).

2 État de l'art

2.1 Destin des pesticides dans l'environnement

Le sol constitue une ressource agricole essentielle, offrant la capacité de produire, distribuer et stocker divers matériaux et produits chimiques. Cependant, il est fréquemment exposé à divers polluants, en particulier les pesticides, qui peuvent y pénétrer par de multiples façons. Ils peuvent être introduits dans le sol notamment par des applications directes, des déversements accidentels, le ruissellement de produits appliqués sur les plantes ou par l'incorporation de matières végétales contaminées (Szpyrka et al., 2020).

Une fois dans le sol, ces pesticides peuvent se disperser dans l'écosystème terrestre ou être transportés vers des systèmes aquatiques par le biais de l'écoulement de surface et du lessivage, ainsi que par l'érosion causée par le vent et les mouvements des animaux (Chaudhari et al., 2023). Ce déplacement vers des zones non ciblées entraîne non seulement des pertes économiques pour les agriculteurs et un contrôle inefficace des nuisibles, mais également une potentielle contamination environnementale (Tiryaki et al., 2010).

D'après Szpyrka et al. (2020), plusieurs processus influencent le devenir des pesticides une fois dans le sol. Ceux-ci incluent l'**adsorption**, où les pesticides se fixent aux particules du sol (Chaplain et al., 2011) ; le **lessivage**, qui est le transfert de particules fines d'un horizon éluvial vers un horizon illuvial (Quénard et al., 2011) ; la **dégradation**, qui peut être déterminée par des facteurs biotiques et abiotiques (Aislabie et al., 1995) ; l'**évaporation**, où les pesticides volatils passent à l'état gazeux ; et enfin, diverses **transformations chimiques** et **microbiologiques**.

2.1.1 Répartition initiale des pesticides

Le destin des pesticides dans l'environnement est fortement influencé par leur répartition initiale. Ce concept décrit la proportion de pesticides retrouvée dans l'air, le sol, l'eau, les plantes et les animaux au moment de l'application. Cette quantité dépend de plusieurs facteurs dont la formulation, la méthode et le taux d'application, la topographie, la végétation et les conditions météorologiques (Tiryaki et al., 2010). Une fois appliqués, les pesticides peuvent pénétrer les plantes par les feuilles ou les racines. Si les pesticides sont systémiques, ils se répartissent ensuite à travers le système vasculaire de la plante, perturbant ainsi ses processus

vitaux. Le niveau de résidus de pesticides dans la plante dépend de la capacité de chaque espèce végétale à absorber et métaboliser la substance active (Szpyrka et al., 2020).

2.1.2 Persistance et rétention dans le sol

La persistance des pesticides dans le sol, souvent exprimée en termes de demi-vie, représente la durée nécessaire pour que la moitié de la dose initiale se dégrade. En fonction de leur demi-vie, les pesticides peuvent être classés en trois catégories : non persistants (moins de 30 jours), modérément persistants (30 à 100 jours) et persistants (plus de 100 jours) (Tiryaki et al., 2010). La persistance des pesticides, qui peut exposer les microorganismes du sol à des niveaux soutenus de substances toxiques, est influencée par des facteurs tels que la stabilité, la volatilité, la solubilité, la formulation, ainsi que la méthode et le site d'application. Les conditions environnementales, comme la température, l'humidité et le vent, jouent également un rôle crucial, tout comme les propriétés du sol et des plantes. (Edwards, 1975).

La rétention, quant à elle, fait référence à l'adsorption, un processus par lequel les pesticides se fixent aux particules du sol. C'est le passage d'un soluté d'une phase aqueuse à la surface d'un adsorbant solide. Ce phénomène dépend des différents constituants du sol et de leurs mécanismes d'interaction avec les pesticides (Chaplain et al., 2011). Pour évaluer la capacité de rétention d'un pesticide dans le sol, il est nécessaire de calculer le coefficient de partage du carbone organique du sol (Koc). Ce coefficient représente le rapport entre la concentration d'un produit chimique adsorbé par le sol et sa concentration dans l'eau du sol, normalisé en fonction du carbone organique du sol (Équation 1) (Reddy et al., 1994). En résumé, un Koc élevé indique une forte affinité pour le carbone organique, entraînant une rétention prolongée et une faible mobilité dans le sol, tandis qu'un Koc faible signifie une affinité moindre, favorisant une plus grande dispersion et mobilité des pesticides dans le sol. Le coefficient Koc est donc un paramètre crucial pour prédire le destin et le transport des produits chimiques dans l'environnement (Hodson et al., 1988).

$$Koc = \frac{\frac{\text{substance chimique adsorbée } (\mu g)}{\text{carbone organique } (g)}}{\text{concentration en solution aqueuse } \left(\frac{\mu g}{mL}\right)}$$

Équation 1: Coefficient de partage du carbone organique (Hodson et al., 1988).

2.1.3 Dégradation des pesticides dans le sol

La dégradation des pesticides dans l'environnement est largement déterminée par une combinaison de facteurs biotiques et abiotiques (Baćmaga et al., 2014). C'est principalement grâce à l'action des microorganismes que ces substances sont transformées (Aislabie et al., 1995). Cette transformation microbiologique joue un rôle critique dans le devenir et le comportement des pesticides dans le sol, les décomposant en produits plus simples sous l'influence des microorganismes et de leurs enzymes (Kaufman, 1974; Aislabie et al., 1995).

Les conditions environnementales, telles que la température et l'humidité du sol, exercent une influence significative sur le taux de dégradation microbienne des pesticides. En général, des températures et une humidité plus élevée accélèrent ce processus, tandis que des périodes de sécheresse ou de basse température peuvent le ralentir (Szpyrka et al., 2020). De plus, les propriétés physico-chimiques du sol, telles que le pH, la teneur en matière organique, l'aération et la capacité d'échange cationique, influent sur les populations microbiennes du sol et sur les processus de dégradation (Kaufman, 1974).

La dégradation des pesticides s'effectue également de manière plus rapide dans les couches superficielles du sol, où l'activité biologique est la plus intense. Ainsi, en cas de fortes précipitations juste après l'application des pesticides, la substance active peut migrer vers les couches plus profondes du sol, où les conditions sont moins propices à la dégradation microbienne (Szpyrka et al., 2020).

En conclusion, les pesticides dans le sol subissent plusieurs processus, à savoir l'adsorption, le lessivage, l'évaporation et des transformations chimiques et microbiologiques (Figure 1). Ces processus complexes de dégradation des pesticides dans le sol sont cruciaux à comprendre pour évaluer et minimiser leur impact sur l'environnement (Koçak, 2023).

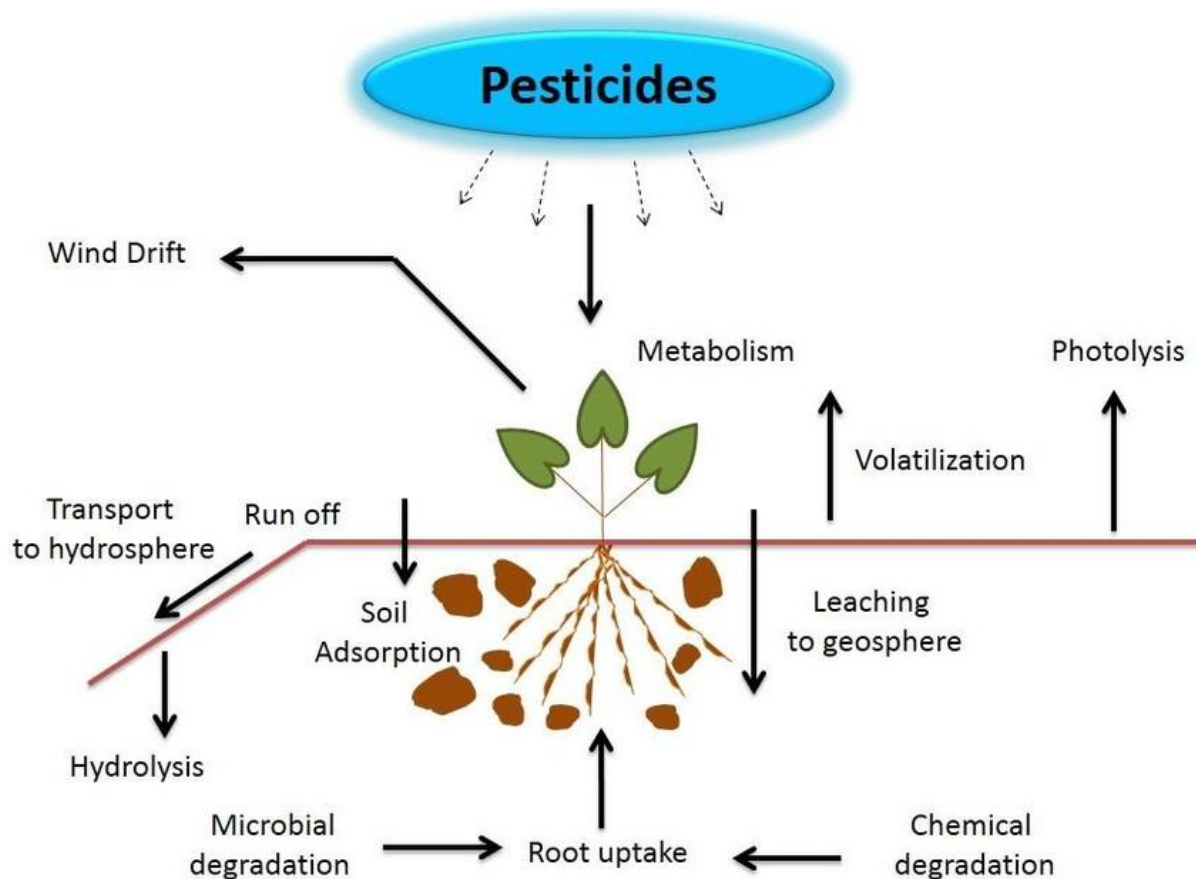


Figure 1: Destin des pesticides dans le sol (Koçak, 2023)

2.2 Problématique des pesticides dans l'environnement et leurs impacts sur les microorganismes du sol

Les pesticides sont couramment utilisés en agriculture pour lutter contre les adventices, les pathogènes et les ravageurs, garantissant ainsi des rendements élevés pour répondre à la demande croissante de la population (Hussain et al., 2009; Martin-Laurent et al., 2016).

A l'échelle mondiale, environ trois millions de tonnes de pesticides sont appliquées chaque année (Hussain et al., 2009). Ces produits phytosanitaires, bien qu'essentiels à la production agricole puisqu'ils contribuent à réduire les pertes et augmenter le rendement, ont des effets néfastes sur l'environnement (Tiryaki et al., 2010). En effet, selon Martin-Laurent et al., (2016), seulement 0,1% des pesticides appliqués atteignent l'organisme cible, tandis que le reste contamine les sols environnants. Les affirmations précédentes sont appuyées et enrichies par les conclusions de Baćmaga et al. (2014), qui soulignent que la part résiduelle des pesticides

pollue non seulement les sols, mais peut également avoir un impact sur les êtres humains, les animaux et les végétaux.

Comme précédemment mentionné, la commercialisation des pesticides est rigoureusement encadrée en Europe. Cependant, les données concernant l'impact écotoxicologique de ces produits sur les fonctions écosystémiques des sols demeurent lacunaires. Bien qu'il existe des tests pour évaluer l'impact sur les macroorganismes et les microalgues non-cibles, aucun n'existe encore pour évaluer le risque réel pour les microorganismes hétérotrophes, tels que les bactéries et les champignons (Martin-Laurent et al., 2016). Pourtant, plusieurs dizaines de milliers d'espèces différentes de microorganismes et des milliards de bactéries trouvent refuge dans un seul gramme de sol (Thiour-Mauprivez et al., 2019).

Martin-Laurent et al., (2016) soulignent également que les tests actuels concernant les microorganismes sont bien trop globaux, se limitant à mesurer la minéralisation du carbone et de l'azote, sans considérer les éventuelles modifications de l'abondance, de la diversité et de l'activité de la communauté microbienne exposée aux pesticides. Or, ces modifications peuvent considérablement porter préjudice à de nombreux services écosystémiques (Thiour-Mauprivez et al., 2019).

Bien que l'application de pesticides puisse parfois réduire la diversité microbienne, elle peut aussi augmenter la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes (WANG et al., 2006). De plus, certains groupes de microorganismes peuvent utiliser les pesticides appliqués comme source d'énergie et de nutriments, ce qui leur permet de se multiplier (Johnsen et al., 2001).

Outre les modifications des communautés microbiennes, les pesticides affectent également les processus biochimiques du sol en diminuant les activités enzymatiques, lesquelles sont des indicateurs biologiques de la fertilité du sol. Les impacts négatifs des pesticides sur les enzymes du sol, telles que les hydrolases, les oxydoréductases et les déshydrogénases, sont largement documentés dans la littérature (Hussain et al., 2009). Cependant, Megharaj et al. (1999) ont démontré que certains pesticides, tels que le DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)éthane), un insecticide, peuvent effectivement augmenter les activités enzymatiques du sol lorsqu'ils sont appliqués à faible concentration. Par exemple, certains de ses métabolites comme le DDD (1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)éthane) et le DDE (1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)éthylène) ont été observés pour augmenter l'activité de la déshydrogénase par rapport au contrôle, qui n'a pas été traité avec les pesticides ci-dessus.

Il est finalement difficile de se positionner quant au rôle des pesticides dans la perturbation de l'environnement du sol, puisque les résultats de recherche divergent dans la littérature, sont peu nombreux et sont propres à chaque groupe de microorganismes étudiés (Hussain et al., 2009).

2.3 Herbicides problématiques dans l'environnement

Les herbicides représentent 60 % du volume total des pesticides utilisés à l'échelle mondiale (Dayan, 2019) et environs 30% dans les États membres de l'Union Européenne (Thiour-Mauprivez et al., 2023). Ces produits phytosanitaires sont constitués de petites molécules qui ciblent spécifiquement les processus vitaux des plantes, en en faisant ainsi des outils essentiels pour la gestion efficace des mauvaises herbes (Dayan, 2019; Rangani et al., 2021).

Cette étude se concentre sur deux herbicides posant des problèmes environnementaux : le FUEGO[®], qui contient du métazachlore comme substance active, et le CARPATUS[®], composé de flufénacet et de diflufenican comme substances actives. Le choix de ces herbicides est motivé par plusieurs raisons. Premièrement, l'objectif était d'inclure un herbicide contenant des substances per- et polyfluoroalkylées (PFAS), des composés chimiques de plus en plus préoccupants à l'heure actuelle. Deuxièmement, pour le projet MICROSENSE, il était essentiel de sélectionner des substances actives ayant un impact significatif non seulement sur le sol mais aussi sur l'eau.

2.3.1 FUEGO[®] (Métazachlore)

Le métazachlore, également connu sous le nom de 2',6'-diméthyl-N-(pyrazol-1-ylméthyl)-chloroacétanilide, constitue la substance active principale de l'herbicide FUEGO[®] et est généralement appliqué à une concentration d'environ 1,5 l/ha, à raison de deux fois par an maximum. Appartenant à la famille chimique des chloroacétanilides, il est largement utilisé pour maîtriser les mauvaises herbes pendant les saisons hivernales et printanières, principalement sur les Brassicacées telles que le colza (*Brassica napus* L.) et les choux cultivés (*Brassica oleracea* L.). À des concentrations faibles, cet herbicide agit comme un inhibiteur d'enzymes végétales, pénétrant dans les racines et l'hypocotyle des plantes, perturbant ainsi le processus de division cellulaire en inhibant la biosynthèse des protéines, des acides gras à très longue chaîne (AGTLC) et de la lignine (Baćmaga et al., 2014; Karier et al., 2017).

Une fois appliqué dans le sol, le métazachlore subit généralement une dégradation rapide, avec une demi-vie, c'est-à-dire le temps nécessaire pour que sa concentration diminue de moitié dans le sol, variant de 19 à 82 jours (Baćmaga et al., 2014). D'après Beulke et al. (2001), le

métazachlore déposé dans le sol affecte notablement l'activité des microorganismes du sol. Les effets secondaires du métazachlore sur ces microorganismes sont influencés par des conditions environnementales telles que le type de sol, sa température et son humidité, pouvant altérer sa stabilité, sa disponibilité et sa toxicité pour les microorganismes. Les auteurs suggèrent également que les sols riches en matière organique et soumis à des températures plus élevées favorisent une dégradation accélérée du métazachlore, ce qui pourrait réduire la sensibilité des microorganismes à ses effets néfastes.

Actuellement autorisé jusqu'au 31 octobre 2027, le métazachlore demeure sujet à un manque d'informations concernant sa dissipation dans l'environnement et ses impacts écotoxicologiques sur les communautés microbiennes du sol, justifiant ainsi la nécessité d'approfondir les études à ce sujet (Szpyrka et al., 2020; “Recherche de produits phytopharmaceutiques | Phytoweb,” May-15-2024a). Par ailleurs, des recherches ont révélé que le métazachlore, lorsqu'appliqué en doses élevées, peut avoir un effet destructeur sur certaines propriétés du sol, tel que l'activité hydrolytique, le pH du sol, la capacité d'échange cationique et la saturation en bases. Cela souligne la nécessité d'une utilisation prudente de cet herbicide. Celui-ci affecte également la biodiversité et le dénombrement des microorganismes du sol. Finalement, une introduction non maîtrisée de métazachlore dans l'environnement du sol peut entraîner la destruction des habitats du sol et la propagation de cette substance chimique à d'autres composants de l'environnement naturel (Baćmaga et al., 2014). De plus, le métazachlore a été officiellement classé comme suspecté d'être cancérogène (Authority (EFSA) et al., 2017).

2.3.2 CARPATUS®

L'herbicide CARPATUS® est couramment utilisé sur les cultures d'escourgeon (*Hordeum vulgare* L.), bénéficiant d'une autorisation jusqu'au 15/06/2026. Ce produit comprend deux substances actives : le diflufenican et le flufénacet. Son application vise à prévenir la croissance des mauvaises herbes dans les cultures susmentionnées afin de maintenir leur rendement (“Recherche de produits phytopharmaceutiques | Phytoweb,” May-15-2024b).

2.3.2.1 Flufénacet

Le flufénacet, également connu sous le nom de 4'-fluoro-N-isopropyl-2'-(5-trifluorométhyl-1,3,4-thiadiazol-2-yloxy) acétanilide, est une nouvelle substance active développée par l'entreprise Bayer. Il est recommandé pour contrôler diverses mauvaises herbes dans un large éventail de cultures telles que le maïs, les céréales ou encore le coton. Il s'est avéré efficace contre plusieurs types de mauvaises herbes annuelles et dicotylédones à petites graines. Le

flufénacet est souvent utilisé en combinaison avec d'autres herbicides comme le métosulam, le diflufenican et le métribuzine (Gupta et al., 2002).

Ce composé est appliqué sur le terrain à une dose variant de 300 à 800 g/ha et sa demi-vie varie de 10 à 31 jours dans le sol (Gupta et al., 2002; Dücker et al., 2019). Le flufénacet présente un faible coefficient de sorption organique (kfoc) et une mobilité modérée, bien qu'il se dégrade plus rapidement que le diflufenican (Willkommen et al., 2019).

2.3.2.2 Diflufenican

Le diflufenican, également connu sous le nom de N-(2,4-difluorophenyl)-2-[3-(trifluorométhyl)phenoxy]-3-pyridinecarboxamide), est la substance active des herbicides utilisée en pré- et postémergence pour le contrôle sélectif des mauvaises herbes à feuilles larges et des graminées dans les cultures de céréales d'hiver. Il présente une solubilité assez faible et une demi-vie variant de 15 à 30 semaines dans l'environnement (Ashton et al., 1994).

Les études suggèrent que le diflufenican se dégrade lentement dans le sol, avec des effets toxiques significatifs sur la biomasse microbienne du sol et sur les activités enzymatiques, et possède un coefficient de sorption organique élevé (kfoc) (Tejada, 2009). De plus, l'association de sa demi-vie élevée, combinée à sa dégradation lente, contribue à sa persistance prolongée dans l'environnement (Willkommen et al., 2019).

2.3.2.3 Combinaison de flufénacet et diflufenican

La combinaison de flufénacet et de diflufenican est souvent utilisée comme solution alternative aux herbicides contre lesquels certaines populations de mauvaises herbes sont devenues résistantes dans les cultures de céréales d'hiver. Ces deux composés agissent de manière complémentaire : le flufénacet inhibe une enzyme nécessaire à la synthèse des AGTLC chez les plantes, tandis que le diflufenican inhibe une enzyme, le phytoène désaturase, conduisant à la dégradation de la chlorophylle (Gitsopoulos et al., 2024).

Cependant, les informations sur les effets combinés de ces substances actives sur les divers groupes de microorganismes du sol restent limitées. Des études ont néanmoins observé une diminution significative de l'activité microbienne et des modifications structurales dans le sol traité avec ces substances actives (Carpio et al., 2020).

2.4 Rôle crucial de la qualité et de la santé des sols

Le sol joue un rôle crucial en reliant les écosystèmes terrestres et aquatiques ainsi que l'atmosphère. Un sol de qualité agit comme un filtre naturel, épurant l'air et l'eau (Pathak et al., 2005). De plus, sa qualité est un indicateur déterminant de l'état général de l'environnement, de la sécurité alimentaire et de la viabilité économique (Sharma et al., 2010). La dégradation de la qualité des sols se manifeste par des changements négatifs dans ses propriétés physiques, chimiques et biologiques (Pathak et al., 2005). Dans ce cadre, il semble crucial d'évaluer la qualité des sols pour mesurer la durabilité des systèmes agricoles et des pratiques de gestion de terres (Doran et al., 1994).

2.4.1 Qualité et santé d'un sol

La **qualité des sols** se réfère à l'aptitude d'un type de sol spécifique à remplir ses fonctions dans les écosystèmes naturels ou gérés. Cela inclut sa capacité à soutenir la productivité des plantes et des animaux, à maintenir ou améliorer la qualité de l'eau et de l'air, et à favoriser la santé et l'habitat humain (Karlen et al., 1997).

Le concept de **santé des sols**, quant à lui, ajoute l'idée que le sol est une ressource vivante et limitée. Il est défini comme la capacité continue du sol à fonctionner comme un système vivant essentiel, en tenant compte des limites de l'écosystème et de l'utilisation des terres. Cela implique de maintenir la productivité biologique, de préserver ou d'améliorer la qualité de l'air et de l'eau, et de promouvoir la santé des plantes, des animaux et des humains (Doran et al., 1994).

2.4.2 Impact des populations microbiennes sur la qualité des sols

Les microorganismes jouent un rôle essentiel dans les propriétés chimiques et biologiques du sol. En effet, ils contribuent au recyclage des nutriments, favorisant ainsi la biodisponibilité des éléments essentiels pour la production primaire. Par exemple, ils interviennent dans les processus du cycle de l'azote, à la fois en minéralisant l'humus et en participant à la fixation d'azote atmosphérique par symbiose avec les légumineuses. De plus, ils participent au maintien de la structure du sol et à la dégradation des polluants, ainsi qu'à la modification de la spéciation chimique des métaux (Christel et al., 2022).

Dans ce contexte, il est évident que la présence des microorganismes est nécessaire pour garantir la qualité du sol. En effet, une qualité de sol médiocre peut se traduire, outre ses aspects physiques, par une population microbienne affaiblie, caractérisée par une faible diversité, une

abondance réduite et une activité diminuée. C'est la résilience et la résistance de cette population microbienne qui détermineront l'impact d'une perturbation, telle que l'application d'un produit phytosanitaire (Griffiths et al., 2013) (Figure 2).

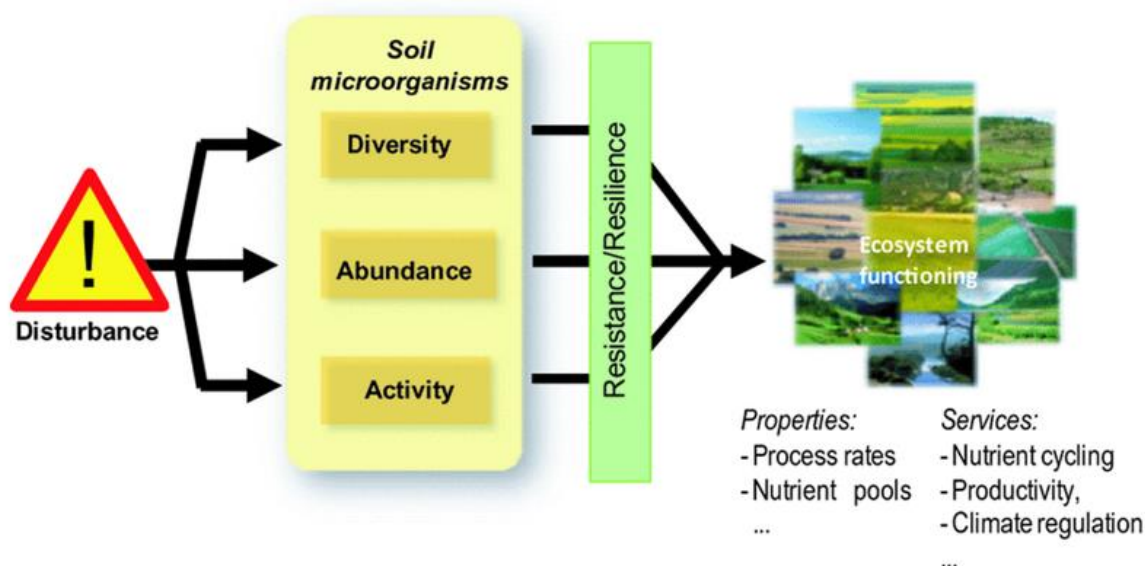


Figure 2: Réponse de l'écosystème du sol face aux perturbations, influencée par la résistance et la résilience de la communauté microbienne du sol (Griffiths et al., 2013). © 2013 Fédération des sociétés européennes de microbiologie

2.5 Nécessité de disposer d'indicateurs pour évaluer la qualité des sols

Les indicateurs de qualité des sols sont des caractéristiques mesurables essentielles pour évaluer la capacité du sol à remplir ses fonctions de production et à maintenir son environnement. Ces indicateurs jouent un rôle crucial pour évaluer l'impact des interventions de gestion sur la qualité des sols agricoles. Cependant, il n'existe pas d'ensemble universel d'indicateurs applicables à toutes les situations ; ainsi, il est nécessaire de sélectionner des indicateurs pertinents en fonction des conditions spécifiques du sol et des objectifs de gestion (Pathak et al., 2005). Les indicateurs les plus couramment utilisés dans la littérature ont été recensés par Arshad et al., (2002) dans le tableau 1 et leurs seuils dépendent du lieu, du temps et de l'utilisation des sols.

Tableau 1: Indicateurs clés pour l'évaluation de la qualité des sols (d'après (Arshad et al., 2002))

Selected indicator	Rationale for selection
Organic matter	Defines soil fertility and soil structure, pesticide and water retention, and use in process models
Topsoil-depth	Estimate rooting volume for crop production and erosion
Aggregation	Soil structure, erosion resistance, crop emergence and early indicator of soil management effect
Texture	Retention and transport of water and chemicals, modeling use
Bulk density	Plant root penetration, porosity, adjust analyses to volumetric basis
Infiltration	Runoff, leaching and erosion potential
pH	Nutrient availability, pesticide absorption and mobility, process models
Electrical conductivity	Defines crop growth, soil structure, water infiltration; presently lacking in most process models
Suspected pollutants	Plant quality, and human and animal health
Soil respiration	Biological activity, process modeling; estimate of biomass activity, early warning of management effect on organic matter
Forms of N	Availability to crops, leaching potential, mineralization/immobilization rates, process modeling
Extractable N, P and K	Capacity to support plant growth, environmental quality indicator

2.5.1 Indicateurs chimiques

La gamme des éléments potentiels servant d'indicateurs chimiques pour le sol est vaste, et le choix final dépendra de la fonction du sol et du processus pris en compte. Ces éléments incluent le pH, la salinité, le taux de matière organique, la capacité d'échange cationique (CEC), l'état nutritionnel des plantes, les concentrations d'éléments potentiellement toxiques, et peut-être le plus crucial, la capacité du sol à se protéger contre les changements de ses propriétés chimiques (Pathak et al., 2005).

2.5.2 Indicateurs physiques

Les indicateurs physiques se concentrent principalement sur la disposition physique des particules solides et des pores du sol. Ils englobent la texture du sol, sa capacité de rétention d'humidité, sa densité apparente, sa porosité, la résistance et la stabilité des agrégats, ainsi que la formation de croûtes. Ils prennent également en compte l'étanchéité de surface, le compactage et la profondeur (Pathak et al., 2005).

2.5.3 Indicateurs microbiens

Les indicateurs microbiens jouent un rôle crucial dans l'évaluation de la qualité du sol, offrant une perspective dynamique et sensible aux changements de gestion des sols et de climat. Contrairement aux paramètres physiques ou chimiques, les indicateurs microbiens peuvent être utilisés dès les premiers stades pour évaluer la qualité du sol. Ces indicateurs comprennent divers paramètres biologiques tels que les populations de microorganismes, de méso-

organismes et de macro-organismes, les taux de respiration, les activités enzymatiques, les taux de minéralisation des nutriments, la biomasse microbienne et une caractérisation plus détaillée des fractions de matière organique du sol (Pathak et al., 2005)

Ainsi, la diversité biologique, en particulier la diversité microbienne, offre un indicateur fiable de la durabilité de la fertilité biologique, de sa résilience et de la productivité végétale. En évaluant la proportion des populations bactériennes et fongiques du sol, elle fournit des informations essentielles sur son fonctionnement global (Thibault et al., 2018).

3 Matériel et méthodes

3.1 Herbicides

Deux herbicides ont été choisis pour l'élaboration de ce travail de fin d'études :

- FUEGO® (9192/B) : contient 500g/L de métazachlore, notable pour son impact sur l'activité des microorganismes du sol déjà rapporté dans la littérature (Beulke et al., 2001).
- CARPATUS® (11084P/B) : contient 400g/L de diflufenican et 200 g/L de flufénacet, deux composés per et polyfluoroalkylés (PFAS) connus pour leur persistance dans le sol et leurs impacts environnementaux (Glüge et al., 2020).

3.2 Dispositif expérimental

L'expérience a été réalisée sous forme de microcosmes en laboratoire, permettant une régulation précise des paramètres, un suivi rigoureux et une meilleure reproductibilité.

Le dispositif expérimental comprend deux facteurs : la temporalité et la dose agronomique d'herbicide appliquée, avec trois répétitions par dose. Les doses appliquées, couramment utilisées dans de nombreuses études écotoxicologiques (Terol et al., 2024), sont les suivantes :

- La dose de référence agronomique (Dose 1x) ; pour un scénario d'exposition réaliste.
- Une dose dix fois supérieure à la dose de référence (Dose 10x) ; pour un scénario d'exposition extrême (worst case scenario) permettant d'évaluer des effets potentiellement observables en cas d'expositions répétées, bien que parfois éloignées de la réalité agronomique.
- Une dose dix fois inférieure à la dose de référence (Dose 0,1x) ; pour un scénario de moindre exposition.
- Une dose contrôle (Dose ctrl) ; pour un scénario sans exposition, contenant uniquement de l'eau et servant alors de témoin.

Afin de visualiser l'impact des herbicides au fil du temps, différentes temporalités ont été envisagées. Initialement, trois temporalités ont été choisies : 3 jours, 3 semaines et 3 mois après application des herbicides. À chaque intervalle de temps, quatre expérimentations ont été réalisées : une évaluation de l'impact du pesticide sur l'activité enzymatique microbienne, sur la respiration globale du microbiote du sol, une analyse des biomasses bactériennes et fongiques

par q-PCR ainsi qu'une analyse de la diversité bactérienne par Metabarcoding 16S. Par la suite, une quatrième temporalité précoce a été ajoutée, après seulement 3 heures d'incubation, se focalisant sur la mesure de l'activité enzymatique et de la respiration microbienne.

Ainsi, quatre temporalités ont été étudiées pour évaluer l'impact de ces herbicides sur les communautés microbiennes du sol. Trois répétitions biologiques ont été considérées par modalité testée. Au total, 48 microcosmes ont donc été mis en place par herbicide étudié. La figure 3 présente un schéma expérimental des microcosmes utilisés lors de l'étude d'un herbicide.

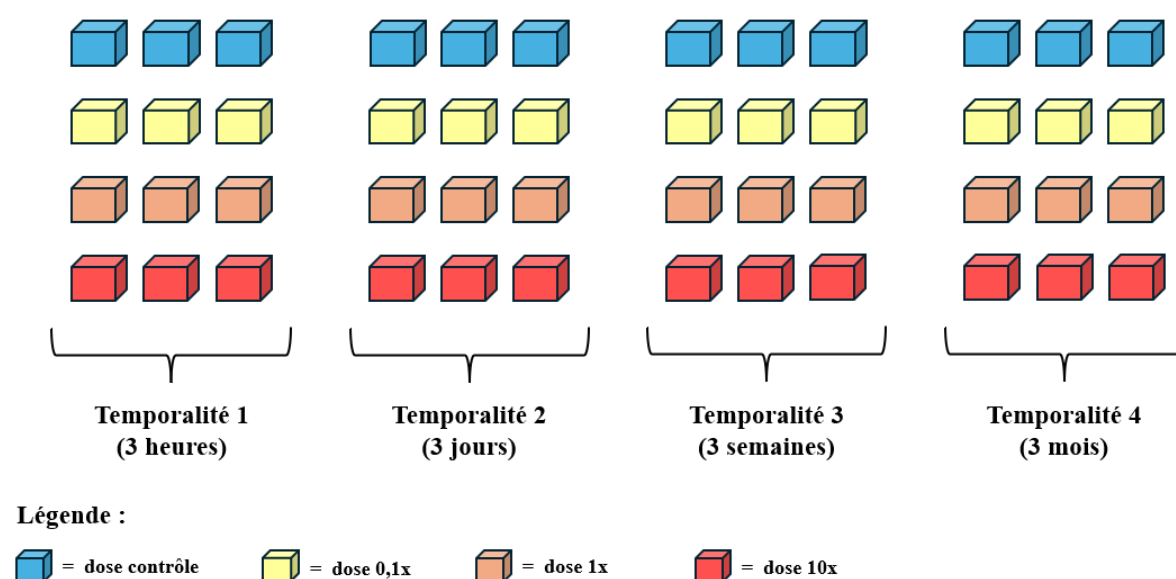


Figure 3: Plan expérimental des microcosmes pour un herbicide étudié.

3.2.1 Prélèvement de sol

Le prélèvement des échantillons du sol utilisé pour construire les microcosmes a été effectué dans une parcelle expérimentale d'essai en agriculture biologique du CRA-w.

La parcelle étudiée est située rue du Zémont à Gembloux, aux coordonnées géographiques 50°56'07.3"N, 4°72'02.6"E (Figure 4). Le type de sol de celle-ci est limoneux à drainage favorable à modéré. Elle constitue la cinquième parcelle d'un essai en agriculture biologique dirigé par Morgan Abras du CRA-W. Aucun produit phytosanitaire n'a été appliqué sur cette parcelle depuis de nombreuses années, garantissant ainsi un environnement exempt de ces substances.

Le sol de cette parcelle n'est pas labouré et subit uniquement un désherbage mécanique. La fertilisation est assurée par des légumineuses, qui enrichissent naturellement le sol, ainsi que par deux apports de fumier par rotation. La rotation des cultures inclut principalement des cultures associées, et cette année, la culture est le colza associé à du trèfle.



Figure 4: Photo satellite de la localisation de la parcelle de prélèvement des échantillons (WalOnMap).

Les premiers prélèvements de sol ont été effectués le 21 février 2024 à l'aide d'une tarière manuelle, dans la couche superficielle, à 25 cm de profondeur. L'échantillonnage, réalisé de manière aléatoire dans la parcelle, a permis de collecter environ 3,5 kg de terre. Le sol a ensuite été tamisé à 8 mm, les matières végétales et inorganiques restantes ont été éliminées, et le reste a été homogénéisé dans des barquettes en aluminium. Ces échantillons ont été acclimatés à l'obscurité dans une étuve à 22°C pendant 16 jours.

Cette manipulation a été répétée le 18 avril 2024 pour le deuxième herbicide à tester. De plus, des prélèvements supplémentaires ont été effectués pour les temporalités précoces de chaque herbicide, le 11 avril 2024 et le 6 juin 2024, toujours sur la même parcelle.

3.2.2 Mise en place des microcosmes

Des microcosmes ont été mis en place en introduisant 80 g de terre dans des récipients cylindriques fermés de 120 ml. Les concentrations d'herbicide FUEGO® à appliquer dans chaque microcosme ont été déterminées en fonction de la concentration de métazachlore et des doses recommandées. Les doses testées incluaient des applications de 0,1x, 1x, et 10x la dose recommandée. Le calcul détaillé des dilutions se trouve en annexe 1 pour FUEGO® et annexe 2 pour CARPATUS®.

4 ml d'eau ou de solution d'herbicide ont été appliqués dans chaque microcosme pour garantir une répartition homogène de l'herbicide. Ces derniers ont ensuite été homogénéisés et placés dans une étuve à 22°C dans l'obscurité.

Des prélèvements par sacrifice ont ensuite été effectués sur les microcosmes à 3 heures, 3 jours, 3 semaines et 3 mois après les traitements. Les microcosmes ont été aérés sous hotte à flux laminaire pendant 15 minutes chaque semaine.

3.3 Étude de l'activité microbienne par analyse de l'activité enzymatique par fluorescence

Le test évaluant l'activité enzymatique des populations microbiennes permet d'obtenir une estimation de l'activité microbienne globale dans un échantillon de sol (Szabó et al., 2022). Le principe de base repose sur l'ajout de substrats synthétiques liés à un colorant fluorescent aux échantillons de sol. L'activité enzymatique est mesurée lorsque le colorant fluorescent est libéré du substrat par une réaction catalysée par une estérase, lipase ou protéase. Une fluorescence élevée indique une dégradation plus importante du substrat, traduisant ainsi une activité microbienne globale plus forte (Steinweg & McMahon, 2012).

Des solutions d'échantillons de sol ont été préparées en suspendant une masse constante de sol frais (1,250 g) dans un tampon phosphate à pH 7,6 (50 mM K_2HPO_4 + 9,55 mM KH_2PO_4). Après homogénéisation et sonication, une plaque à 96 puits a été utilisée pour les mesures de fluorescence, à raison de 7 puits par échantillon, ainsi que 12 puits contrôles. Chaque puits contenait une solution standardisée composée des solutions de sol préalablement préparées (sauf pour le contrôle), de tampon phosphate et du substrat diacétate de fluorescéine. La fluorescence a été mesurée sur un spectrophotomètre, le TECAN Spark® en mode cinétique sur 25 cycles de 5 minutes chacun, avec des longueurs d'onde d'excitation de 465 nm et d'émission de 535 nm.

Une droite de calibration a été établie pour quantifier la fluorescence mesurée en termes de concentration de fluorescéine libérée, afin d'interpréter les résultats du test FDA. La calibration a utilisé une solution de sol témoin avec de la fluorescéine. Le protocole détaillé, adapté de Thierry Beguiristain, est disponible en annexe 3.

3.4 Étude de la respiration microbienne par Microresp™

Le kit MicroResp™ est un outil précieux pour évaluer l'activité microbienne. Il présente des avantages significatifs en termes de réduction de temps, de coûts et d'espace en laboratoire. Ce test repose sur une méthode colorimétrique détectant les changements de pH d'une solution de bicarbonate en quasi-équilibre avec l'espace de tête du puits (Figure 5). En absorbant le CO₂ produit par les microorganismes, un gel contenant un indicateur de pH, le rouge de crésol, change de couleur. L'acidification résultante, due à la réaction du CO₂ avec le bicarbonate pour former des ions carbonates et H⁺, entraîne une diminution du pH et un éclaircissement de l'indicateur coloré (Campbell et al., 2003; The James Hutton Institute, 2019).

En résumé, le gel indicateur a été préparé en utilisant une solution composée de rouge de crésol, de chlorure de potassium et de bicarbonate, ainsi que d'une solution d'agar à 3%. Les puits profonds ont ensuite été remplis avec les échantillons de sol. Les puits ont été scellés avec un tapis de fermeture en caoutchouc percé, permettant le passage du CO₂ et une microplaque. La spectrophotométrie a été utilisée pour mesurer l'absorbance du gel indicateur après 6 heures à température ambiante. La mesure a été effectuée à 570 nm et à 20°C à l'aide du spectrophotomètre Tecan Spark®, ce qui a permis de quantifier le taux d'émission de CO₂ (µg CO₂-C/g/h) lors de la respiration microbienne (Rowell, 1995). Le protocole utilisé, ainsi que les formules employées, ont suivi les instructions du kit MicroResp™ (The James Hutton Institute, 2019) et se trouve en annexe 4.

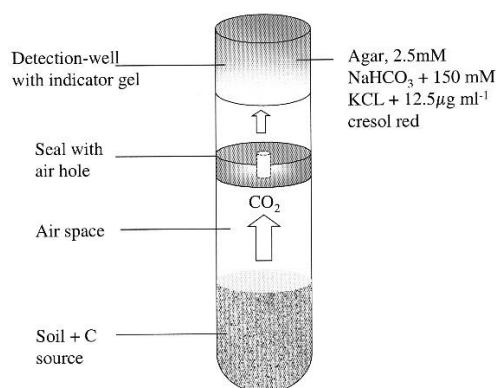


Figure 5: Schéma d'un puits profond relié à un puits de détection, montrant la position et la composition du système de détection de colorants (Campbell et al., 2003).

3.5 Étude de la biomasse microbienne et de la structure des communautés bactériennes

3.5.1 Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN des échantillons de sol a été réalisée selon les recommandations du protocole du kit NucleoSpin® Soil ("NucleoSpin Soil, Mini kit for DNA from soil," March-18-2024). Le protocole détaillé se trouve annexe 5. Il est à noter que cette manipulation a été réalisée seulement sur les échantillons des temporalités 2, 3, et 4.

Des échantillons d'environ 500 mg de sol ont été ajoutés à un tube contenant des billes de céramique. Un tampon d'extraction (ici le tampon SL2, celui-ci ayant montré une lyse optimale du type de sol analysé) a été ajouté au tube pour lyser les cellules et libérer l'ADN. De plus, un « enhancer » a été utilisé pour optimiser les conditions de lyse et maximiser le rendement en ADN.

Après la lyse, le lysat a été filtré pour éliminer les débris et les particules solides. Un autre tampon a été ajouté pour ajuster les conditions de liaison, permettant à l'ADN de se lier à la membrane de silice dans une colonne de spin. L'ADN lié a ensuite subi plusieurs étapes de lavage pour éliminer les contaminants.

Enfin, l'ADN purifié a été élué dans un microtube de centrifugation. La qualité et la quantité de l'ADN extrait ont été vérifiées à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop, permettant de s'assurer que les échantillons étaient de bonne qualité et contenaient suffisamment d'ADN pour les analyses ultérieures. Les grandes étapes de l'extraction d'ADN sont résumées dans la figure 6.

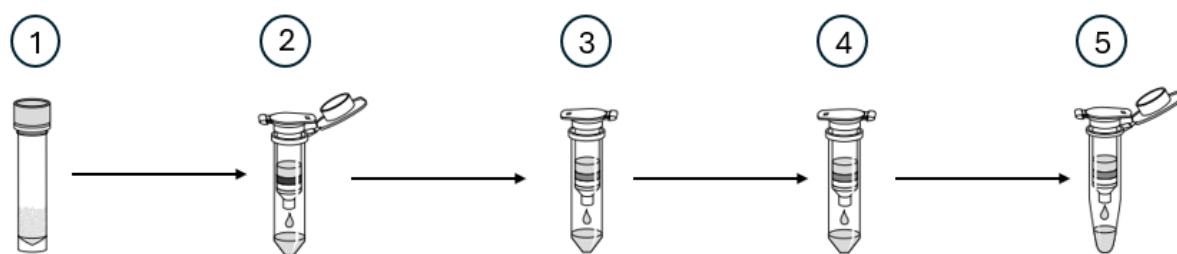


Figure 6: Extraction d'ADN (1= homogénéisation par billes de céramique ; 2 = Filtration du lysat ; 3 = Liaison de l'ADN sur la membrane de silice ; 4 = Lavage de la membrane de silice ; 5 = Elution de l'ADN) (Adapté de ("NucleoSpin Soil, Mini kit for DNA from soil," March-18-2024)).

3.5.2 Étude de la biomasse microbienne par quantification des bactéries et des champignons par q-PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitative en temps réel (qPCR) est une méthode utilisée pour la détection et la quantification des microorganismes dans divers types d'échantillons. Ce procédé repose sur l'amplification quantitative de séquences spécifiques par PCR, permettant de mesurer rapidement les populations de différents microorganismes, tels que les bactéries et les champignons. En évaluant le nombre de copies de gènes spécifiques, la qPCR fournit une estimation précise des populations microbiennes présentes dans les échantillons de sol (Postollec et al., 2011). Cette technique repose sur l'émission d'un signal fluorescent pour détecter et quantifier en temps réel l'amplification de ces fragments d'ADN cibles, ici les régions 16S et 18S pour les bactéries et les champignons, respectivement (Postollec et al., 2011). L'amplification spécifique de ces deux régions génomiques repose sur les deux couples d'amorces suivants :

- Pour le gène 16S :
 - 5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'
 - 5'-ATT ACC GCT GCT GGC A-3'
- Pour le gène 18S :
 - 5'-AIC CAT TCA ATC GGT AIT-3'
 - 5'CGA TAA CGA ACG AGA CCT-3'

L'ADN extrait (3.5.1) a été quantifié avec le spectrophotomètre Nanodrop ND-1000, puis la concentration a été normalisée à 10 ng/μL. La PCR en temps réel a été réalisée avec le thermocycleur BIO-RAD CFX96™ sur des plaques à 96 puits, chaque réaction contenant GoTaq® qPCR Master Mix, des amorces, de l'eau sans nucléase et l'ADN extrait.

Les conditions de réaction pour l'amplification de l'ADN sont de 95°C pendant 2 minutes, 40 cycles de 95°C pendant 15 secondes et 60°C pendant 1 minute. Pour chaque paire d'amorces, des dilutions en série (10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 copies du gène intégré dans un plasmide) sont effectuées et utilisées pour construire une droite d'étalonnage.

Le protocole détaillé de cette manipulation se trouve en annexe 6.

3.5.3 Séquençage et traitement des données de séquençage Nanopore metabarcoding

Pour cette étude, le séquençage d'ADN a été réalisé en utilisant la technologie développée par Oxford Nanopore Technologies (ONT), qui détecte des brins d'ADN simples brins en les faisant passer électrophorétiquement à travers un pore à l'échelle nanométrique (Branton et al., 2008). Le séquençage des échantillons de sol a été effectué au CEBEDEAU par Gilles Quabron, à l'aide du dispositif MinION (Figure 7), un séquenceur de troisième génération (TGS) commercialisée par ONT en 2014. Ce dispositif est particulièrement intéressant en raison de sa petite taille, de son coût réduit, de sa rapidité de séquençage et surtout pour sa capacité à générer des long reads (Lu et al., 2016).

En amont du séquençage à proprement dit, les librairies ont été préparées selon le protocole mis au point par la firme ONT, en utilisant le kit 16S Barcoding 1-24 (SQK-16S024, ONT) (Annexe 7). La préparation des librairies incluait l'extraction de l'ADN (3.5.1) et l'amplification de la totalité du gène ARNr 16S avec ajout de codes-barres spécifiques pour chaque condition. Pour l'amplification du gène, les amorces universelles 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') ont été utilisées (Heuer et al., 1997).

Brièvement, l'étape d'amplification du gène ARNr 16S, réalisée par PCR, a été conduite selon les conditions cycliques suivantes : une dénaturation initiale de 1 minute à 95°C pour un cycle unique, suivie de 25 cycles comprenant une dénaturation à 95°C pendant 20 secondes, une hybridation à 55°C pendant 30 secondes, et une extension à 65°C pendant 2 minutes. Ensuite, une extension finale a été effectuée à 65°C pendant 5 minutes. Les produits de réactions ont été conservés à 4°C après la dernière étape.

Après l'amplification, les échantillons ont été purifiés en utilisant des billes AMPure XP, incluant plusieurs lavages à l'éthanol pour éliminer les impuretés. Les échantillons purifiés ont été quantifiés à l'aide d'un fluorimètre Qubit, et multiplexés en quantités équimolaires.

Cette librairie de séquençage a été chargée avec précaution sur une Flow Cell (version R9.4.1) et séquencée sur un appareil de type MinION. Il est important de noter que les échantillons FUEGO® et CARPATUS® ont été séquencés séparément, sur des Flow Cells différentes et à des moments distincts. Chaque Flow Cell a permis de séquencer un total de maximum 23 échantillons, ainsi qu'un contrôle MOC. Après le séquençage, la Flow Cell a été nettoyée conformément aux instructions, afin de pouvoir être réutilisée ultérieurement.

MinION Sequencer

Internal Structure

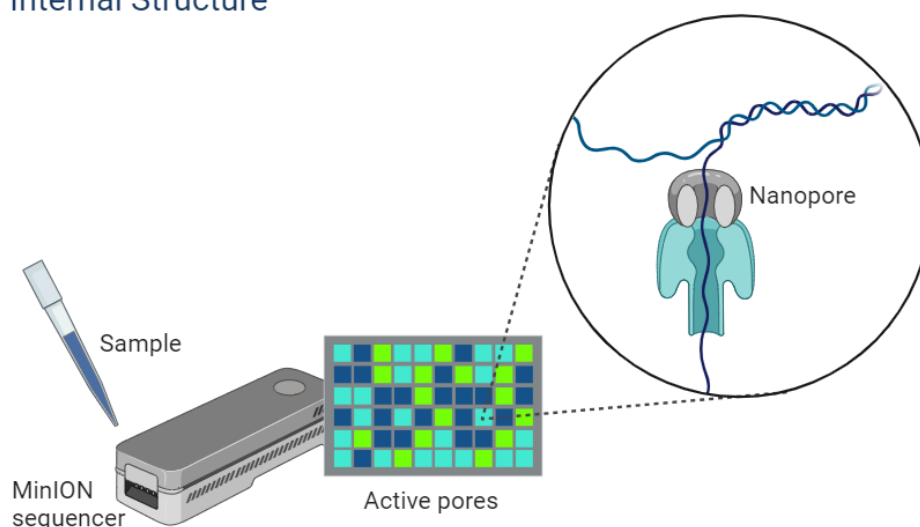


Figure 7: Le dispositif de séquençage MinION. Reprinted from «MinION Sequencer Internal Structure », by BioRender.com (2024). Retrieved from <https://app.biorender.com/biorender-templates>

Le traitement des données de séquençage Nanopore metabarcoding a été réalisé sous la supervision du Dr Benjamin Dubois, bioinformaticien au CRA-W, en utilisant la pipeline PRONAME, qui fait l'objet d'un article en cours de soumission dans la revue BMC Bioinformatics (Dubois et al., 2024). Ce traitement a été effectué uniquement pour les échantillons des temporalités 2 et 3, correspondant respectivement à 3 jours et 3 semaines d'incubation des microcosmes. Les échantillons de la temporalité 4, correspondant à 3 mois d'incubation, n'ayant pas encore été séquencés au moment de la rédaction de ce travail de fin d'études, n'ont pas été inclus dans cette analyse.

La pipeline PRONAME est composée de quatre scripts :

- 1) **praname_import** : Importation et traitement initial des données de metabarcoding Nanopore, incluant le retrait des adaptateurs de séquençage et des amorces, le comptage des reads simplex et duplex, et la génération de graphiques de dispersion pour évaluer la qualité des données.
- 2) **praname_filter** : Filtrage des reads en fonction de leur longueur et de leur qualité. Il permet de travailler avec des reads duplex, simplex ou les deux. Dans cette étude, seules les reads simplex ont été utilisées en raison de la chimie ancienne employée.
- 3) **praname_refine** : Création de séquences consensus par regroupement (clustering) des reads de haute qualité, suppression des singletons, et enregistrement de leur distribution

par échantillon. Le script extrait et polit ensuite les séquences centroïdes de chaque cluster pour corriger les erreurs et filtre les séquences chimériques.

- 4) **praname_taxonomy** : Réalisation de l'analyse taxonomique en utilisant trois bases de données prédéfinies ou personnalisées : deux pour les séquences du gène 16S (Silva v138 et Greengenes2), et une troisième pour l'opéron ribosomal complet, créée en téléchargeant tous les génomes bactériens publiés sur le NCBI (The National Center for Biotechnology Information). Un script maison extrait les copies de l'opéron ribosomal (région 16S-ITS-23S) de chaque génome, et les séquences sont nettoyées à l'aide de la pipeline DB4Q2 (Dubois et al., 2022) pour construire la base de données finale. Les résultats de blastn sont ensuite filtrés et peuvent être réimportés dans QIIME2 pour des analyses supplémentaires.

Après l'analyse bioinformatique, les résultats ont été importés dans QIIME2 (version 2024.2). Les différentes doses d'herbicide appliquées (10x, 1x, 0,1x) ont été comparées au témoin aux deux temporalités.

Dans un premier temps, la qualité de séquençage a été analysée grâce à un graphique indiquant les scores Phreds des échantillons. Ensuite, un barplot des OTU's (unités taxonomiques opérationnelles) a été généré pour chaque herbicide aux deux temporalités en utilisant la commande qiime taxa barplot. Ces graphiques ont illustré la diversité et l'abondance relative des taxons dans chaque échantillon, avec une résolution taxonomique jusqu'au niveau du genre.

3.6 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel R v4.3.1 pour les tests enzymatiques, de respiration et de biomasse microbienne, et via QIIME2 (version 2024.2) pour l'analyse de la structure des communautés bactériennes.

3.6.1 RStudio®

Les données collectées ont été analysées statistiquement à l'aide du logiciel R v4.3.1 via RStudio® (version 2023.06.2 + 561). Les packages Agricolae et ggplot2 ont été utilisés pour effectuer les différents tests statistiques et générer les graphiques.

Les facteurs considérés étaient la dose et la temporalité. Cette dernière, définie par des moments spécifiques, a été traitée comme un facteur catégorique plutôt que comme une variable continue.

Pour évaluer les différences entre les groupes, une ANOVA à deux facteurs ($\alpha = 0,05$) a été réalisée initialement. Les hypothèses de l'ANOVA ont été validées par plusieurs tests. La normalité des résidus a été vérifiée à l'aide du diagramme quantile-quantile (QQ-plot) et de la superposition de la ligne de référence normale (H_0 : distribution normale des résidus), avec les fonctions `qqnorm()` et `qqline()`. L'égalité des variances a été examinée visuellement en traçant les résidus par rapport aux valeurs ajustées (fitted values), confirmant que les dispersions étaient comparables entre les niveaux des facteurs.

Lorsque les conditions d'application de l'ANOVA ont été respectées, les résultats de l'ANOVA ont été interprétés. Ensuite, un test post-hoc de Tukey ($\alpha = 0,05$) utilisant la fonction `HSD.test` a été effectué pour identifier les différences significatives entre les moyennes de chaque modalité. En revanche, si les conditions de l'ANOVA n'ont pas été respectées, un test de Kruskal-Wallis a été utilisé à la place. Dans ce cas, le test post-hoc a été basé sur le critère de la plus petite différence significative de Fisher, avec une correction de Bonferroni pour ajuster les résultats.

Les données ont été présentées sous forme de boxplots, où la moyenne a été indiquée par un point noir. Les différences significatives ($p\text{-valeur} < 0,05$) entre les modalités ont été représentées par des lettres distinctes et mises en évidence par des couleurs différentes lorsqu'une modalité s'est distinguée statistiquement des autres. Les lettres (par exemple, "a", "b", "c", etc.) représentent ces différences. Si deux groupes partagent la même lettre (par exemple, "a" et "a", ou "a" et "ab"), cela signifie qu'ils ne présentent pas de différence significative entre eux. En revanche, des lettres différentes (comme "a" et "b") indiquent une différence significative. Des couleurs différentes dans les boxplots ont été utilisées pour visualiser ces distinctions plus clairement.

3.6.2 QUIIME2

Des analyses statistiques de la diversité alpha ont été effectuées grâce à des tests de Kruskal-Wallis, avec les indices de diversité Observed features, Faith PD et Shannon. La diversité bêta a également été analysée grâce à des tests de PERMANOVA avec les indices de diversité de Bray-Curtis, Jaccard, Weight et Unweight UniFrac. En cas de différence significative, une analyse d'abondance différentielle avec ANCOM-BC a été réalisée pour extraire les tableaux des genres bactériens enrichis ou appauvris dans les échantillons avec les doses d'herbicides par rapport à la dose contrôle.

4 Résultats

4.1 Effet des herbicides FUEGO® et CARPATUS® sur l'activité, la respiration et la biomasse microbienne

4.1.1 Activité microbienne

4.1.1.1 FUEGO®

L'analyse statistique des résultats d'activité enzymatique de la FDA, en fonction de la temporalité et de la dose d'herbicide appliquée, a révélé des différences significatives pour le facteur temporalité ainsi que pour l'interaction entre les facteurs temporalité et dose. Les tests post hoc de Tukey ont mis en évidence les différences significatives entre les différentes temporalités pour chaque dose (Figure 8).

Pour la dose contrôle, la temporalité 1 (3 heures post-traitement) présente une activité enzymatique significativement plus élevée par rapport à la temporalité 2 (3 jours post-traitement). Les temporalités 3 et 4 (3 semaines et 3 mois post-traitement respectivement) sont statistiquement similaires entre elles et ne diffèrent pas significativement des temporalités 1 et 2.

Pour la dose 0,1x, la temporalité 2 montre une activité enzymatique significativement plus faible que les temporalités 1, 3 et 4. Ces dernières ne diffèrent pas significativement entre elles.

En ce qui concerne la dose 1x, la temporalité 4 présente une activité enzymatique significativement plus élevée que la temporalité 2. Les temporalités 1 et 3 n'ont pas de différence significative par rapport aux temporalités 2 et 4.

Pour la dose 10x, la temporalité 4 présente une activité enzymatique significativement plus élevée que les temporalités 1, 2 et 3, qui sont statistiquement similaires entre elles.

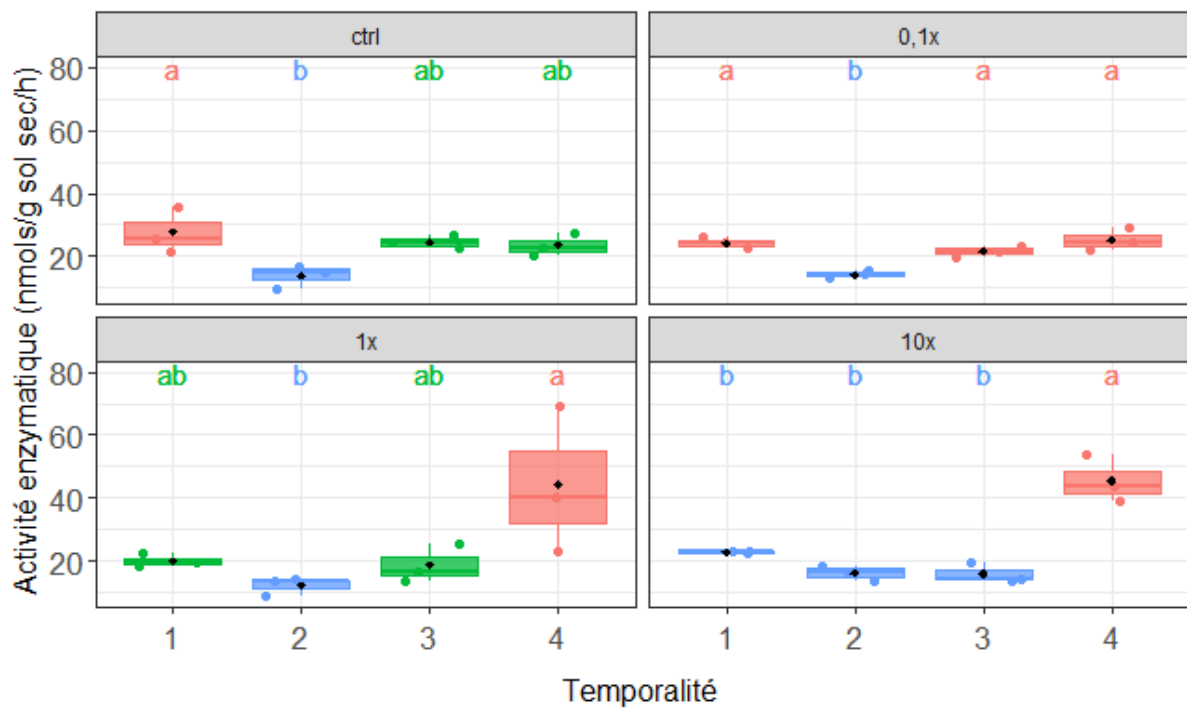


Figure 8: Effet de la temporalité à chaque dose de FUEGO® appliquée sur l'activité enzymatique de la FDA. Des lettres différentes indiquent une différence significative (p -valeur $< 0,05$) entre les moyennes d'activité enzymatique pour les différentes temporalités, selon le test de Tukey. Les points de couleur représentent la dispersion des échantillons et les points noirs représentent les moyennes.

Les analyses supplémentaires visant à évaluer un éventuel effet de la dose d'herbicide sur l'activité enzymatique dans chaque temporalité n'ont montré aucune différence significative pour toutes les temporalités (Figure 9).

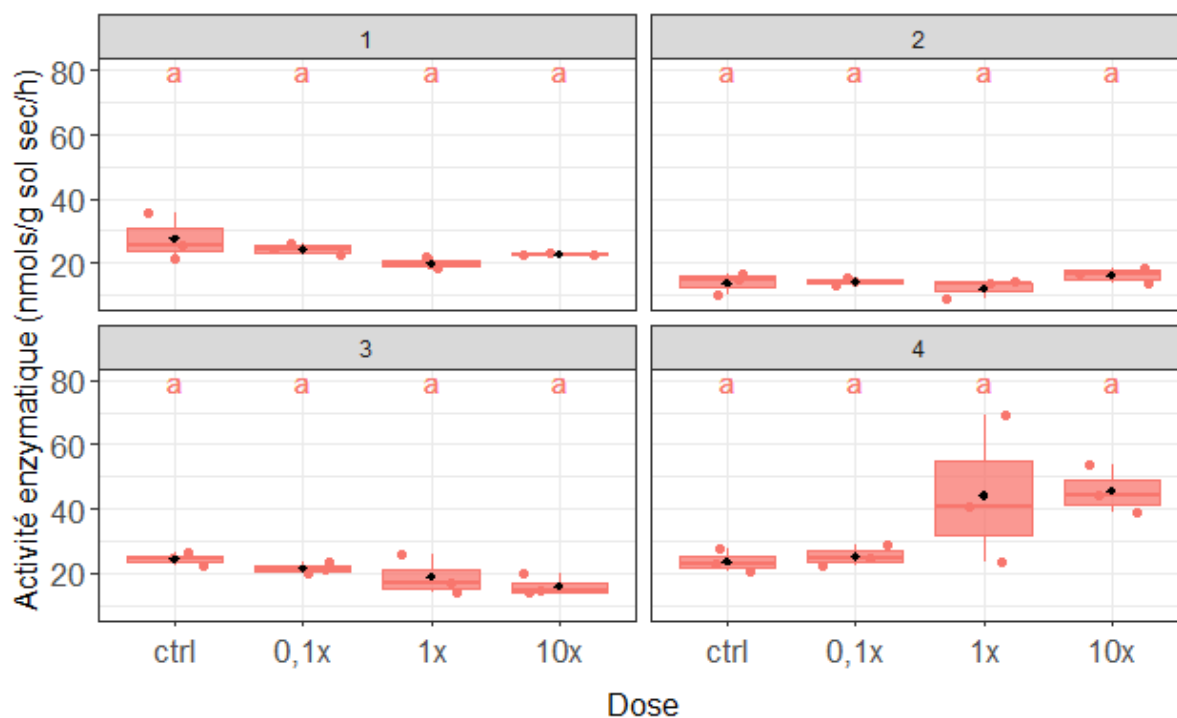


Figure 9: Effet de la dose de FUEGO® appliquée à chaque temporalité sur l'activité enzymatique de la FDA. Des lettres différentes indiquent une différence significative (p -valeur < 0,05) entre les moyennes d'activité enzymatique pour les différentes doses, selon le test de Tukey. Les points de couleur représentent la dispersion des échantillons et les points noirs représentent les moyennes.

4.1.1.2 CARPATUS®

L'analyse statistique des résultats d'activité enzymatique de la FDA, en fonction de la temporalité et de la dose d'herbicide appliquée, a révélé une différence significative pour le facteur temporalité uniquement. Le test post hoc, utilisant le critère de la plus petite différence significative de Fisher avec correction de Bonferroni, a mis en évidence les différences significatives entre les temporalités, indépendamment des doses (Figure 10).

Les résultats montrent que la temporalité 4 présente une activité enzymatique significativement plus élevée que la temporalité 1. Les temporalités 3 et 2 se situent entre les deux et sont statistiquement similaires entre elles.

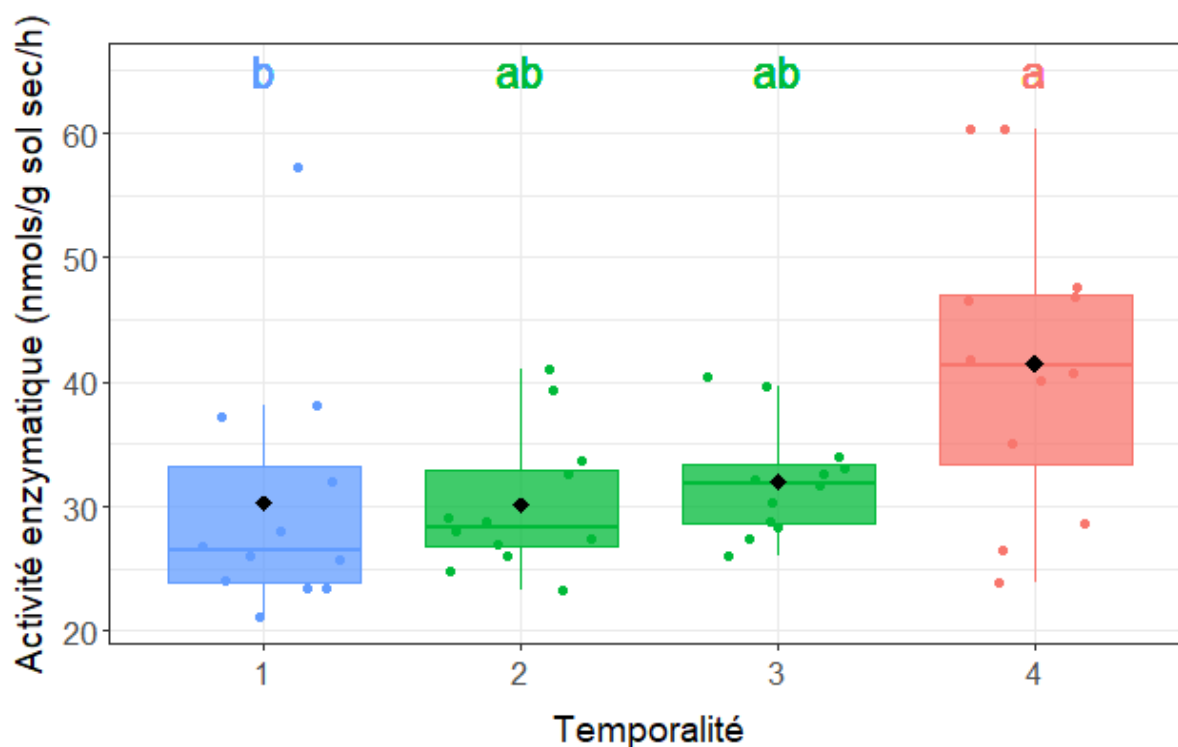


Figure 10: Effet de la temporalité, toutes doses de CARPATUS® appliquée confondues, sur l'activité enzymatique de la FDA. Des lettres différentes indiquent une différence significative (p -valeur $< 0,05$) entre les moyennes d'activité enzymatique pour les différentes temporalités, selon un test de post hoc utilisant le critère de la plus petite différence significative de Fisher avec comme méthode d'ajustement la correction de Bonferroni. Les points de couleur représentent la dispersion des échantillons et les points noirs représentent les moyennes.

4.1.2 Respiration microbienne

4.1.2.1 FUEGO®

L'analyse statistique du taux d'émission de CO₂ en fonction de la temporalité et de la dose d'herbicide appliquée, a révélé des différences significatives pour le facteur temporalité ainsi que pour l'interaction entre les facteurs temporalité et dose. Les tests post hoc de Tukey ont mis en évidence les différences significatives entre les différentes doses pour chaque temporalité (Figure 11).

Pour la temporalité 1, la dose contrôle montre un taux d'émission de CO₂ significativement plus élevé par rapport aux doses 0,1x, 1x et 10x, qui ne diffèrent pas significativement entre elles.

Pour la temporalité 2, les quatre doses présentent des niveaux de taux d'émission de CO₂ statistiquement similaires.

Pour la temporalité 3, la dose 0,1x présente un taux d'émission de CO₂ significativement plus élevé que la dose 10x. Les doses contrôle et 1x se situent entre les deux autres et sont statistiquement similaires entre elles.

Pour la temporalité 4, les quatre doses présentent des niveaux de taux d'émission de CO₂ statistiquement similaires.

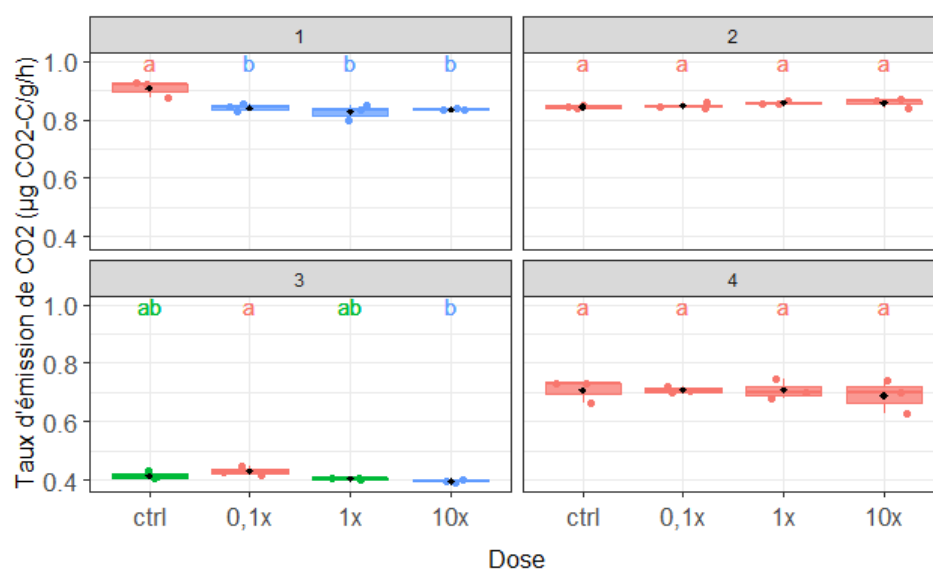


Figure 11: Effet de la dose de FUEGO® appliquée à chaque temporalité sur le taux d'émission de CO₂. Des lettres différentes indiquent une différence significative (p -valeur $< 0,05$) entre les moyennes des taux de CO₂ émis pour les différentes doses, selon le test de Tukey. Les points de couleur représentent la dispersion des échantillons et les points noirs représentent les moyennes.

Les analyses supplémentaires visant à évaluer un éventuel effet de la temporalité sur chaque dose montrent un schéma similaire à travers toutes les doses. Il n'y a aucune différence significative du taux d'émission de CO₂ entre la temporalité 1 et 2, suivie d'une baisse significative en temporalité 3, et d'une augmentation significative en temporalité 4, bien que ce taux reste plus faible que celui observé aux temporalités 1 et 2 (Figure 12).

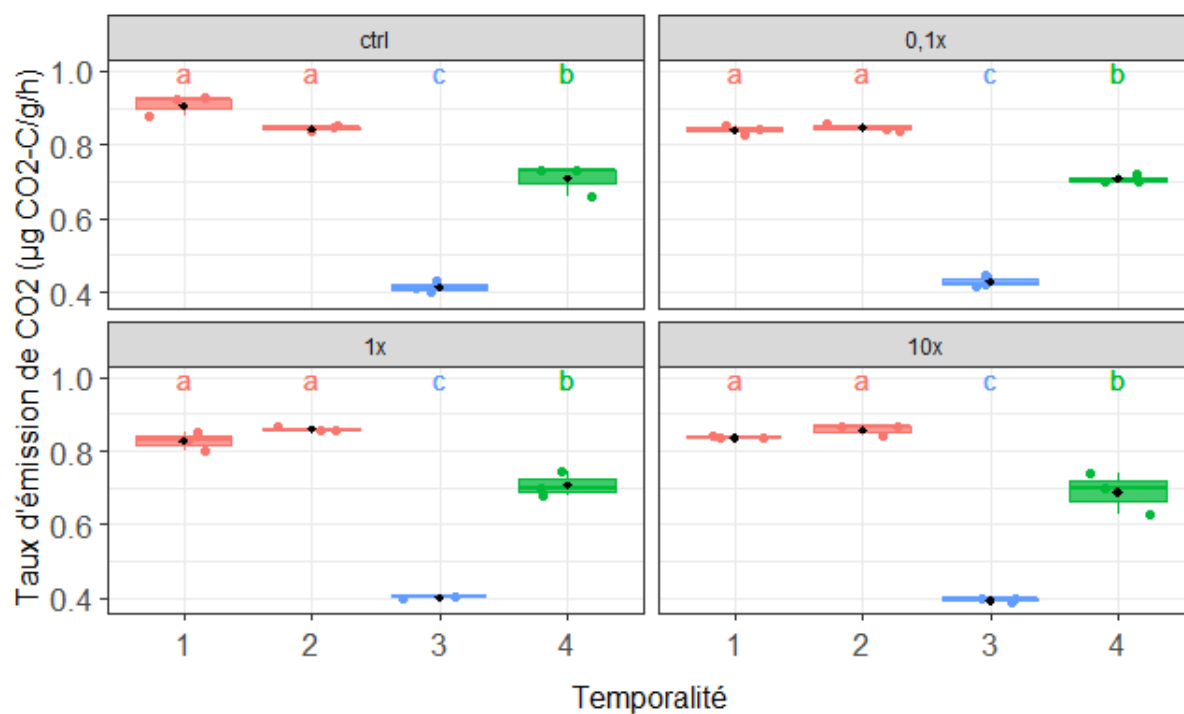


Figure 12: Effet de la temporalité à chaque dose de FUEGO® appliquée sur le taux d'émission de CO₂. Des lettres différentes indiquent une différence significative (p -valeur < 0,05) entre les moyennes des taux de CO₂ émis pour les différentes temporalités, selon le test de Tukey. Les points de couleur représentent la dispersion des échantillons et les points noirs représentent les moyennes.

4.1.2.2 CARPATUS®

L'analyse statistique du taux d'émission de CO₂ en fonction de la temporalité et de la dose d'herbicide appliquée, a révélé des différences significatives pour le facteur temporalité ainsi que pour l'interaction entre les facteurs temporalité et dose. Les tests post de Tukey ont mis en évidence les différences significatives entre les différentes doses pour chaque temporalité (Figure 13).

Pour la temporalité 1, la dose contrôle montre un taux d'émission de CO₂ significativement plus élevé que les doses 0,1x et 1x, qui sont statistiquement similaires entre elles. La dose 10x se situe entre les deux autres et leur est statistiquement similaire.

Pour les temporalités 2, 3 et 4, les quatre doses présentent des niveaux de taux d'émission de CO₂ statistiquement similaires.

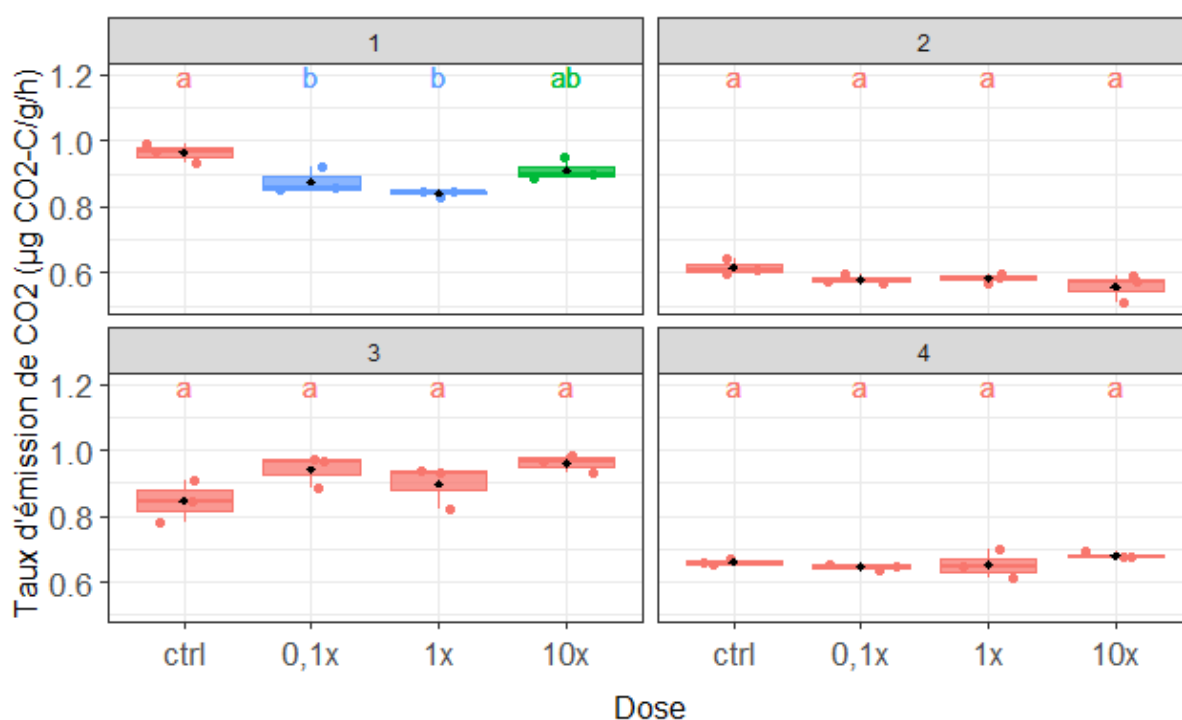


Figure 13: Effet de la dose de CARPATUS® appliquée à chaque temporalité sur le taux d'émission de CO₂. Des lettres différentes indiquent une différence significative (p -valeur $< 0,05$) entre les moyennes des taux de CO₂ émis pour les différentes doses, selon le test de Tukey. Les points de couleur représentent la dispersion des échantillons et les points noirs représentent les moyennes.

Les analyses supplémentaires visant à évaluer un éventuel effet de la temporalité sur chaque dose ont montré des différences significatives à travers toutes les doses (Figure 14).

Pour la dose contrôle, la temporalité 1 présente un taux d'émission de CO₂ significativement plus élevé que la temporalité 3. Les temporalités 2 et 4 ne diffèrent pas significativement entre elles mais montrent des taux d'émission de CO₂ plus faibles que les temporalités 1 et 3.

Pour les doses 0,1x et 1x, les temporalités 1 et 3 présentent des taux d'émission de CO₂ significativement plus élevés que les temporalités 2 et 4. De plus, il n'y a pas de différence significative entre les temporalités 1 et 3, ni entre les temporalités 2 et 4.

Pour la dose 10x, les temporalités 1 et 3 présentent des taux d'émission de CO₂ statistiquement similaires et significativement plus élevés que la temporalité 4. La temporalité 2 montre un taux d'émission de CO₂ significativement plus bas que les autres temporalités.

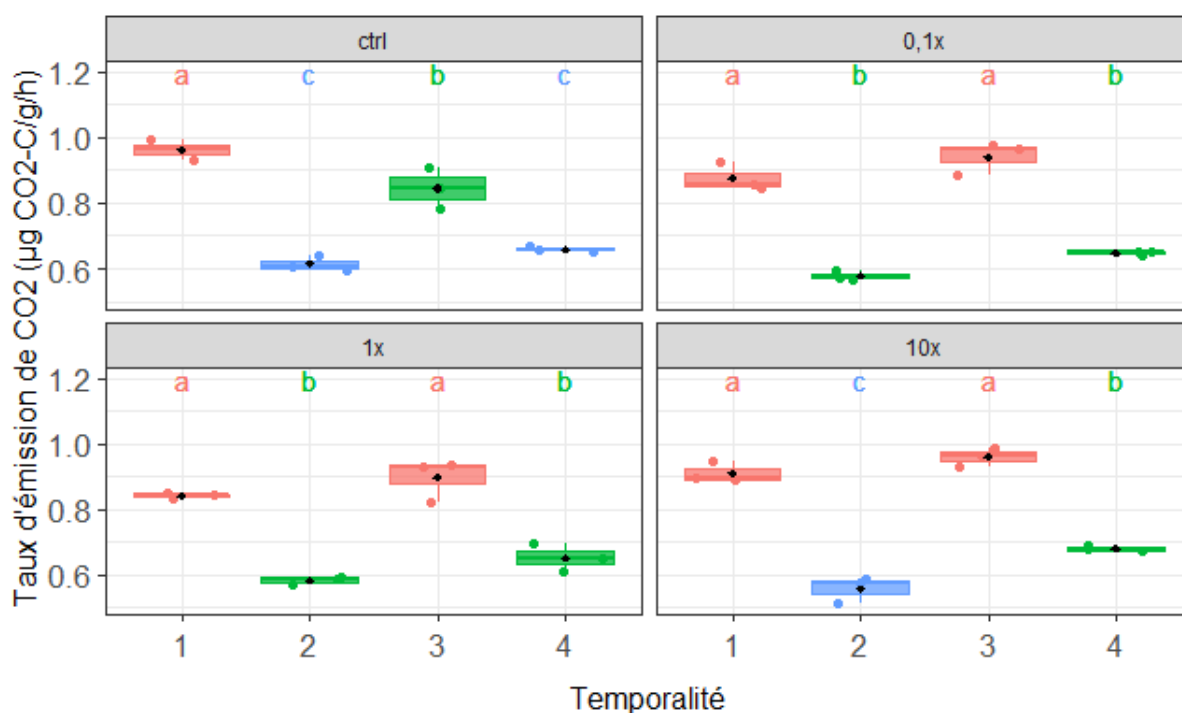


Figure 14: Effet de la temporalité à chaque dose de CARPATUS® appliquée sur le taux d'émission de CO₂. Des lettres différentes indiquent une différence significative (p -valeur < 0,05) entre les moyennes des taux de CO₂ émis pour les différentes temporalités, selon le test de Tukey. Les points de couleur représentent la dispersion des échantillons et les points noirs représentent les moyennes.

4.1.3 Biomasse microbienne

Les courbes des résultats de la q-PCR, ajoutées en annexe 8, montrent la qualité de celles-ci.

4.1.3.1 FUEGO®

L'analyse statistique du nombre de gènes fongiques (18S) en fonction de la temporalité et de la dose d'herbicide appliquée, a révélé des différences significatives pour le facteur temporalité ainsi que pour l'interaction entre les facteurs temporalité et dose. Les tests post de Tukey ont mis en évidence les différences significatives entre les différentes doses pour chaque temporalité (Figure 15).

Pour les temporalités 2 et 4, les quatre doses présentent un nombre de gènes statistiquement similaires.

Pour la temporalité 3, la dose 0,1x ne diffère significativement pas de la dose contrôle. La dose 1x est quant à elle significativement enrichie par rapport au contrôle tandis que la dose 10x en est diminuée.

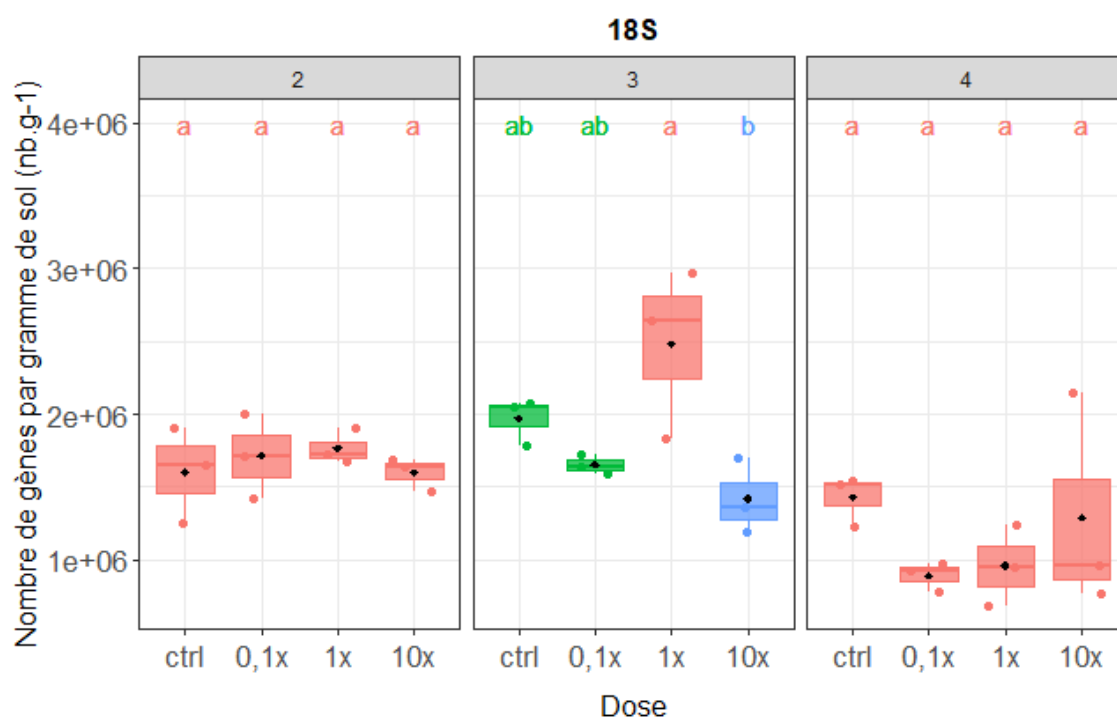


Figure 15: Effet de la dose de FUEGO® appliquée à chaque temporalité sur le nombre de gènes fongiques (18S). Des lettres différentes indiquent une différence significative (p -valeur < 0,05) entre les moyennes des nombres de gènes fongiques pour les différentes doses, selon le test de Tukey. Les points de couleur représentent la dispersion des échantillons et les points noirs représentent les moyennes

Les analyses supplémentaires visant à évaluer un éventuel effet de la temporalité sur chaque dose montrent des différences significatives pour les doses 0,1x et 1x (Figure 16).

Pour la dose 0,1x, la temporalité 4 montre un nombre de gènes significativement plus faible que les temporalités 1 et 2, qui sont statistiquement similaires entre elles.

Pour la dose 1x, la temporalité 3 montre un nombre de gènes significativement plus élevé que la temporalité 4, la temporalité 2 se situant entre les deux.

Pour les doses 10x et contrôle, il n'y a pas de différences significatives entre les différentes temporalités concernant le nombre de gènes.

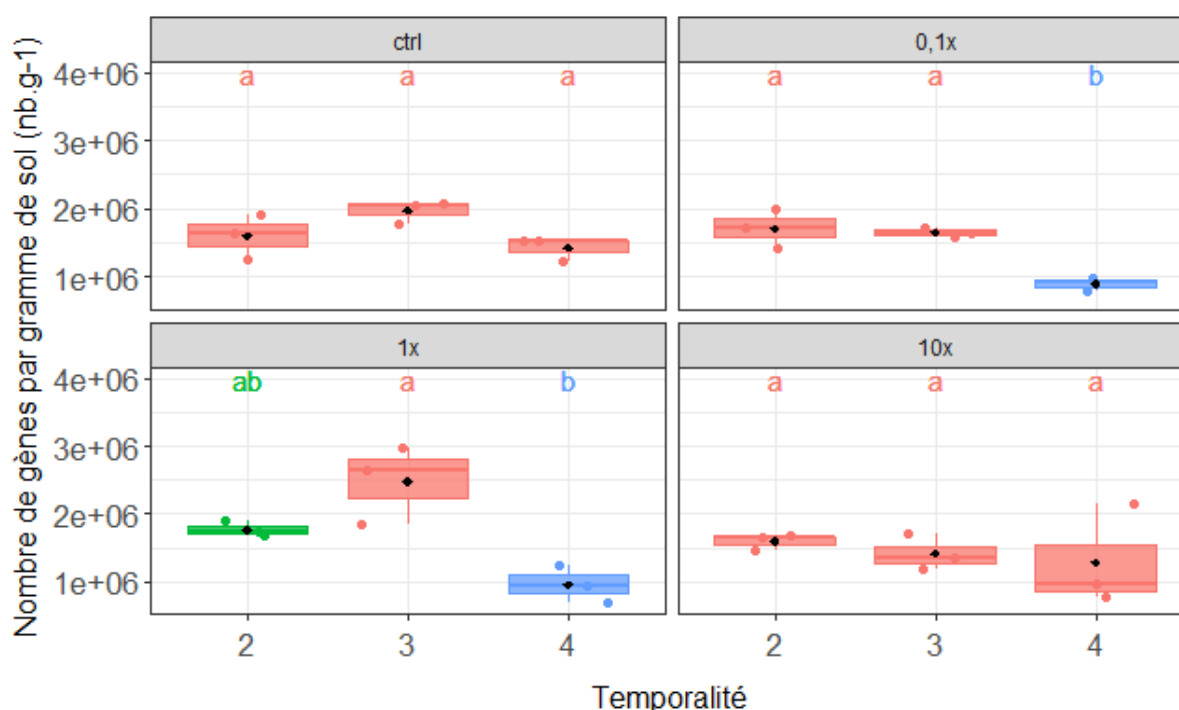


Figure 16: Effet de la temporalité à chaque dose de FUEGO® appliquée sur le nombre de gènes fongiques (18S). Des lettres différentes indiquent une différence significative (p -valeur $< 0,05$) entre les moyennes des nombres de gènes fongiques pour les différentes temporalités, selon le test de Tukey. Les points de couleur représentent la dispersion des échantillons et les points noirs représentent les moyennes.

L'analyse statistique du nombre de gènes bactériens (16S) en fonction de la temporalité et de la dose d'herbicide appliquée n'a révélé aucune différence significative ($\alpha > 0,05$).

4.1.3.2 CARPATUS®

L'analyse statistique du nombre de gènes fongiques (18S) en fonction de la temporalité et de la dose d'herbicide appliquée, a révélé une différence significative uniquement pour l'interaction entre les facteurs temporalité et dose. Les tests post de Tukey ont permis de mettre en évidence les différences significatives entre les différentes doses pour chaque temporalité (Figure 17).

Pour la temporalité 2, les doses 0,1x, 1x et 10x diffèrent significativement du contrôle mais sont statistiquement similaires entre elles.

Pour les temporalités 3 et 4, les quatre doses présentent un nombre de gènes statistiquement similaire.

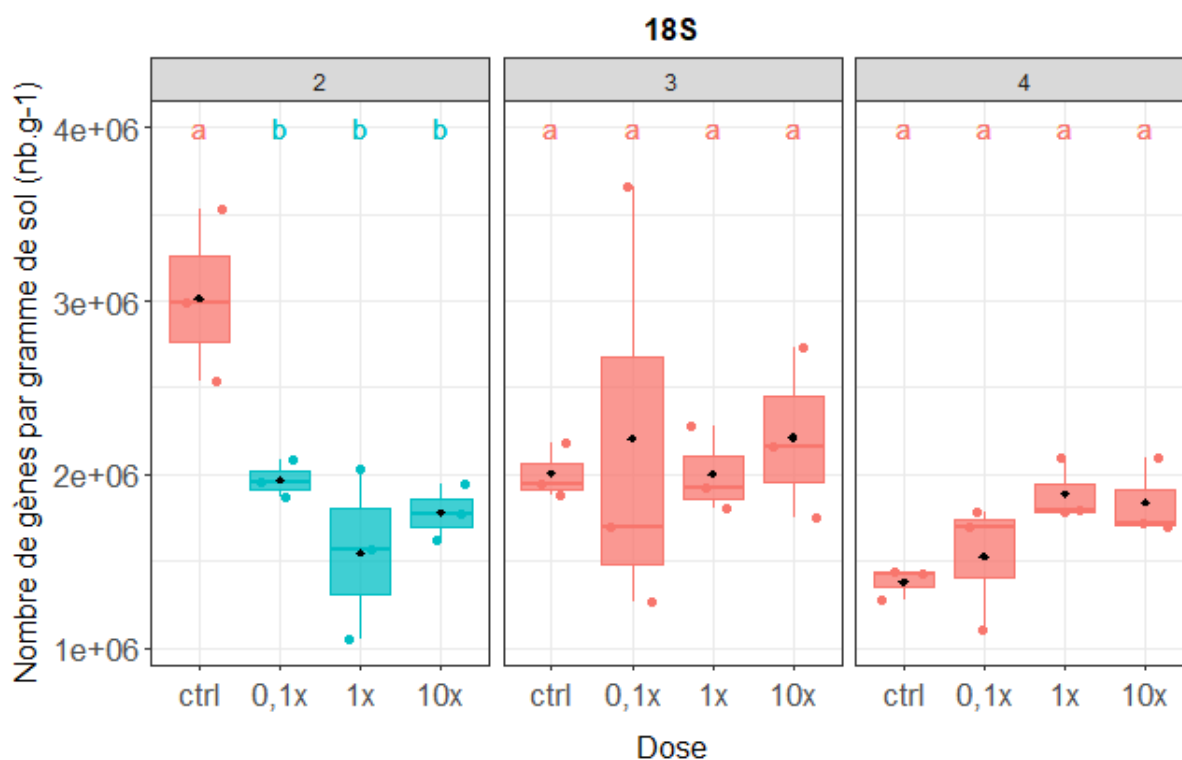


Figure 17: Effet de la dose de CARPATUS® appliquée à chaque temporalité sur le nombre de gènes fongiques (18S). Des lettres différentes indiquent une différence significative (p -valeur $< 0,05$) entre les moyennes des nombres de gènes fongiques pour les différentes doses, selon le test de Tukey. Les points de couleur représentent la dispersion des échantillons et les points noirs représentent les moyennes

Les analyses supplémentaires visant à évaluer un éventuel effet de la temporalité sur chaque dose montrent une différence significative uniquement pour la dose contrôle (Figure 18).

Pour la dose contrôle, la temporalité 1 montre un nombre de gènes significativement plus élevé que les temporalités 3 et 4, qui sont statistiquement similaires entre elles.

Pour les doses 0,1x, 1x, et 10x, il n'y a pas de différences significatives entre les différentes temporalités concernant le nombre de gènes.

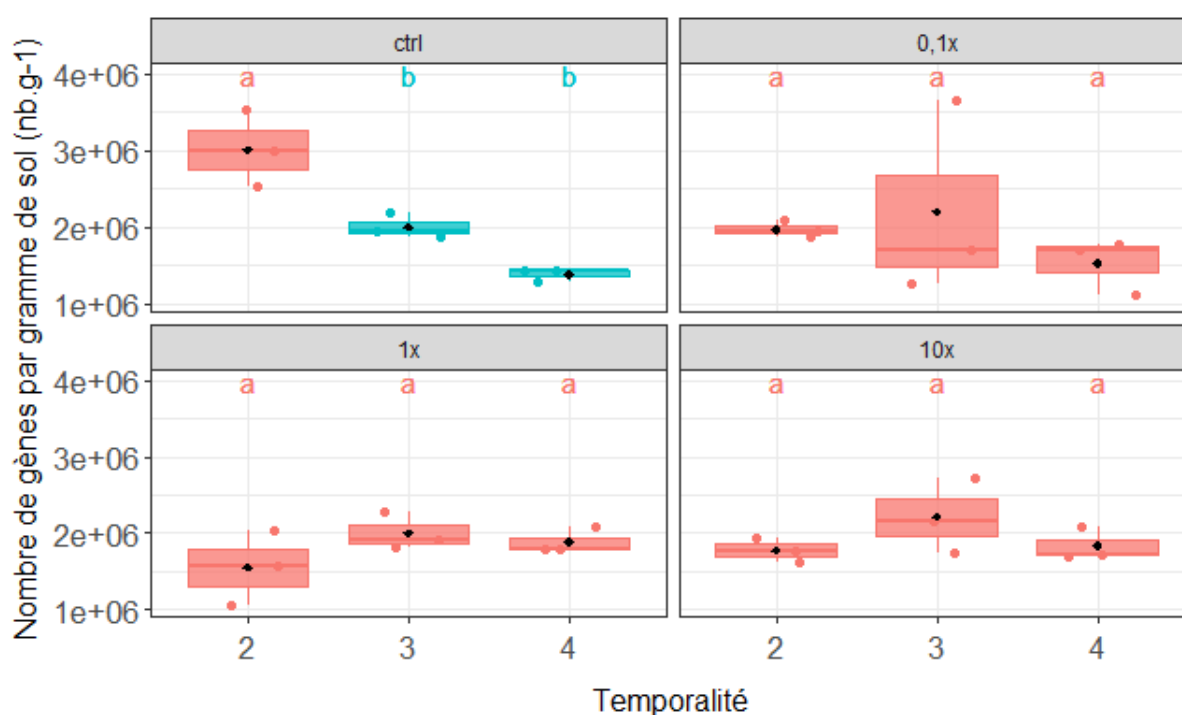


Figure 18: Effet de la temporalité à chaque dose de CARPATUS® appliquée sur le nombre de gènes fongiques (18S). Des lettres différentes indiquent une différence significative (p -valeur < 0,05) entre les moyennes des nombres de gènes fongiques pour les différentes temporalités, selon le test de Tukey. Les points de couleur représentent la dispersion des échantillons et les points noirs représentent les moyennes.

L'analyse statistique du nombre de gènes bactériens (16S) en fonction de la temporalité et de la dose d'herbicide appliquée a révélé une différence significative pour le facteur dose. Les tests post hoc de Tukey, qui comparent des groupes de moyennes, ne révèlent pas de différences significatives entre les groupes, mais la figure 19 montre une tendance à la hausse pour les échantillons traités par rapport au contrôle.

En effet, les résultats montrent que les nombre de gènes bactériens (16S) pour les doses 0,1x, 1x et 10x sont significativement enrichis par rapport au contrôle.

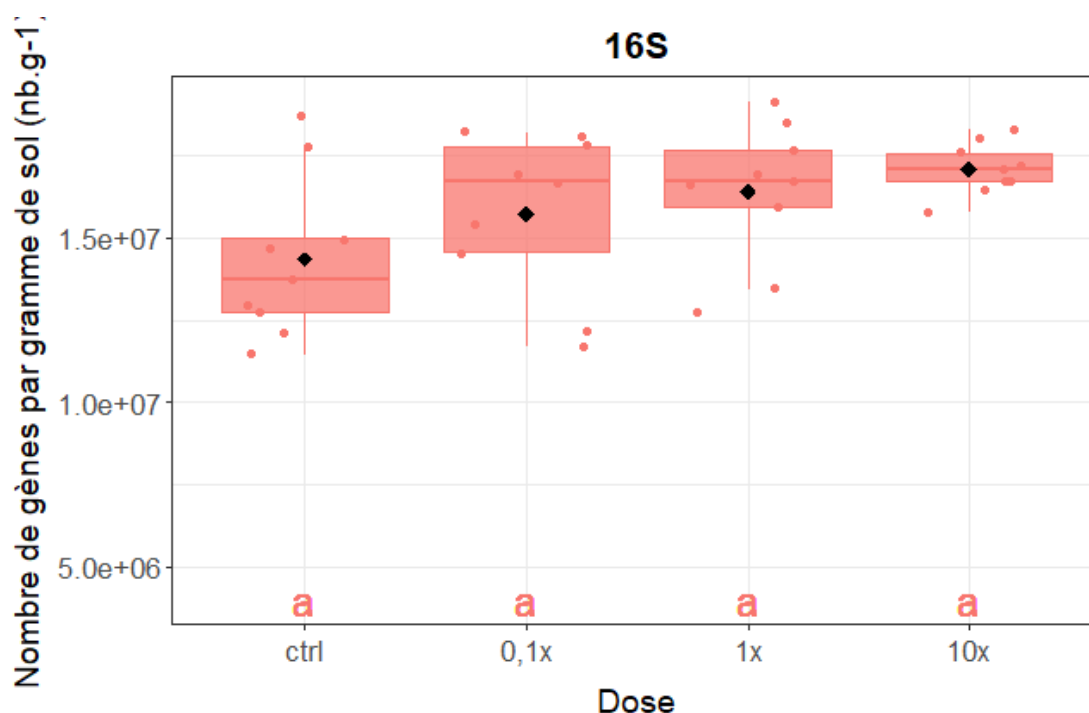


Figure 19: Effet de la dose de CARPATUS® appliquée, toutes temporalités confondues, sur le nombre de gènes bactériens (16S). Des lettres différentes indiquent une différence significative (p -valeur $< 0,05$) entre les moyennes des nombres de gènes bactériens pour les différentes doses, selon un test de post hoc utilisant le critère de la plus petite différence significative de Fisher avec comme méthode d'ajustement la correction de Bonferroni. Les points de couleur représentent la dispersion des échantillons et les points noirs représentent les moyennes

4.2 Effet des herbicides FUEGO® et CARPATUS® sur les communautés bactériennes

L'analyse des données de séquençage à haut débit avec la pipeline PRONAME a commencé par l'évaluation de la qualité des séquences, qui a été réalisée en examinant le graphique représentant la qualité moyenne des reads en fonction de leur longueur. La figure 20 révèle que la longueur des reads atteint environ 1500 paires de bases, ce qui correspond bien à la longueur moyenne du gène 16S. Cependant, la qualité moyenne des séquences se situe entre 10 et 15, ce qui est considéré comme faible. En effet, ces valeurs de qualité sont des scores Phred, où un score Q10 correspond à une précision de 90% (soit 1 erreur sur 10 bases) et un score Q15 correspond à une précision de 96.8% (soit environ 1 erreur sur 32 bases). En comparaison, une qualité maximale est généralement autour de Q30, ce qui correspond à une précision de 99.9% (soit 1 erreur sur 1000 bases).



Figure 20: Interprétation de la qualité des séquences d'ADN pour les herbicides FUEGO® et CARPATUS®, montrant la relation entre la longueur des reads et leur qualité moyenne.

4.2.1 FUEGO®

4.2.1.1 Fréquence relative des OTUs

La figure 21, présentée sous forme d'histogramme cumulé (bar plot), illustre la fréquence relative des OTUs au niveau du genre pour les échantillons FUEGO®, chacun d'eux étant présenté individuellement avec ses répétitions. Ce graphique permet de comparer visuellement la composition taxonomique de chaque échantillon et de visualiser la fréquence d'apparition de ces OTUs parmi les échantillons aux deux temporalités. Il est à noter que l'échantillon 2 de la dose 1x à la temporalité 3 n'a pas été correctement séquencé (nombre de reads faible) et sera dès lors exclu lors des analyses ultérieures. Les légendes des bar plots en figure 22 illustrent les 34 OTUs les plus fréquents.

Ces figures permettent d'affirmer que, de manière générale, les échantillons possèdent un microbiote bactérien similaire entre les deux temporalités.

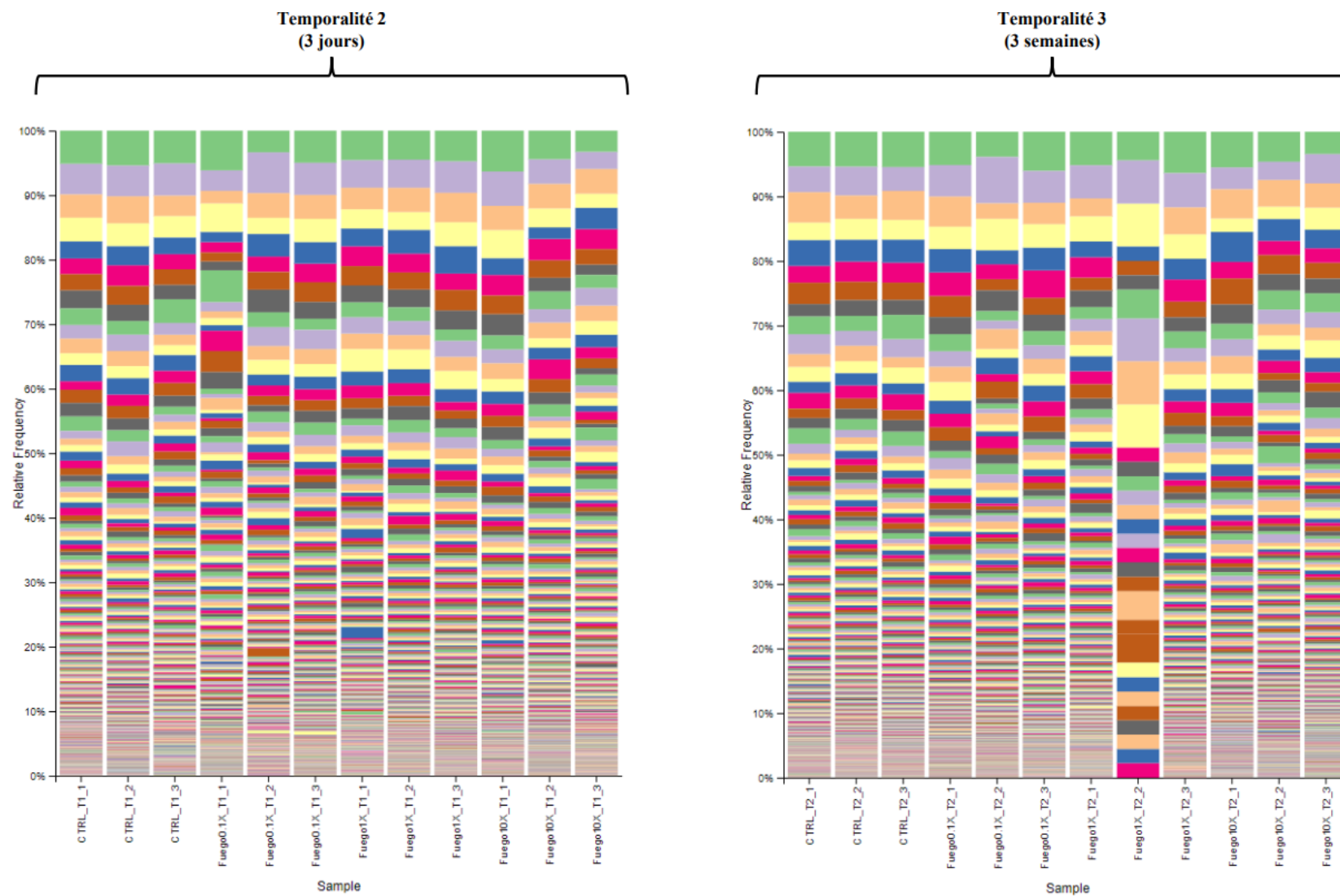


Figure 21: Bar plot des fréquences relatives des genres bactériens de chaque échantillon de l'herbicide FUEGO® aux temporalités 2 et 3.

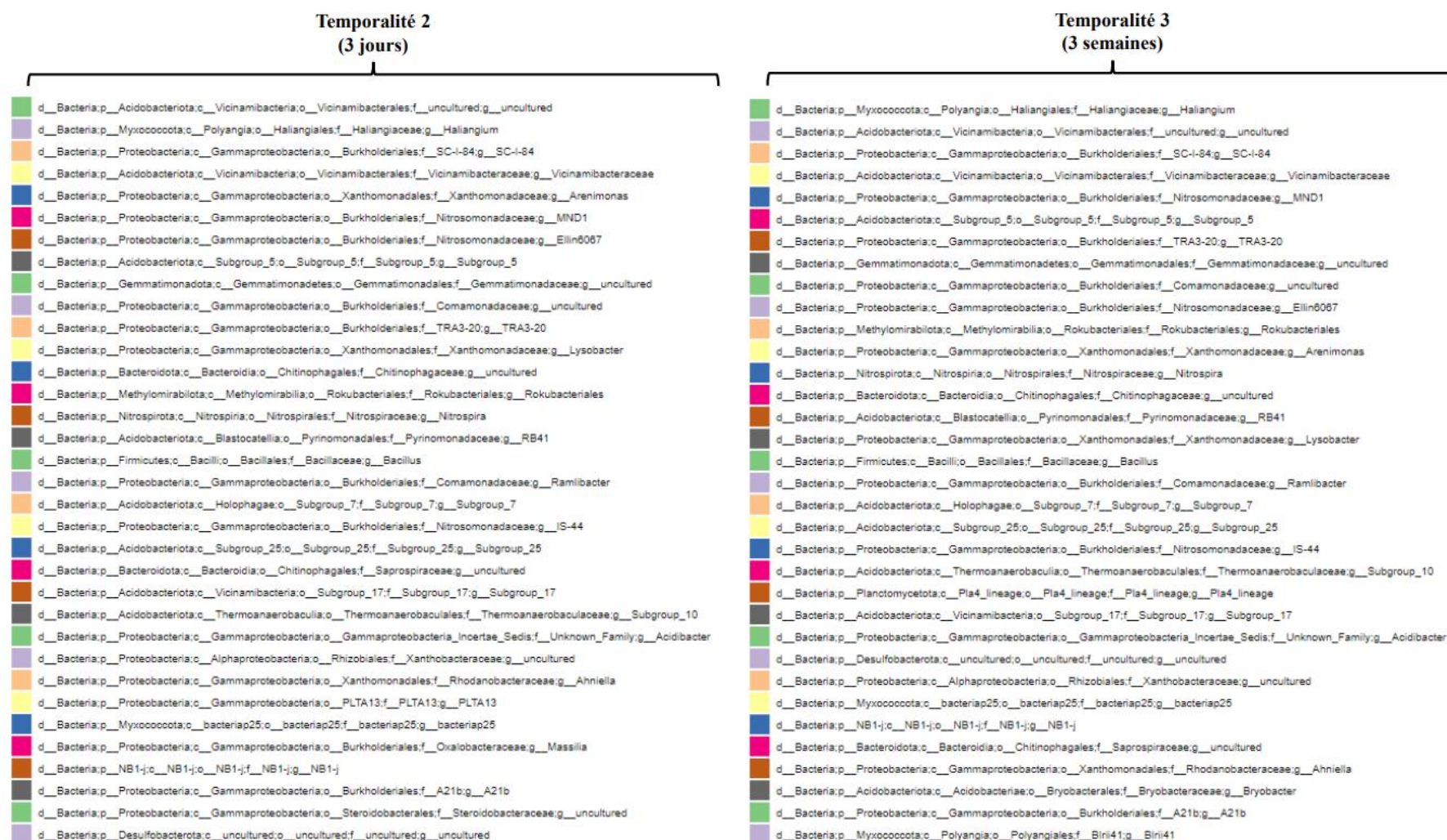


Figure 22: Légende des bar plot des fréquences relatives des genres bactériens de chaque échantillon de l'herbicide FUEGO® aux temporalités 2 et 3.

4.2.1.2 Analyse de la diversité alpha et beta

Les tests statistiques de la diversité alpha et beta n'ont montré aucune différence significative pour les doses 10x, 1x et 0,1x par rapport au contrôle, que ce soit à la temporalité 2 ou à la temporalité 3 (Tableau 2). Par conséquent, aucune analyse d'abondance différentielle n'a été réalisée.

Tableau 2: p-valeur de l'analyse de la diversité alpha et bêta, pour l'herbicide FUEGO® à chaque dose de chaque temporalité, comparée à la dose contrôle. Une p-valeur < 0,05 indique une différence significative.

Indice de diversité	p-valeur					
	Temporalité 2			Temporalité 3		
	Dose 10x	Dose 1x	Dose 0,1x	Dose 10x	Dose 1x	Dose 0,1x
Observed features	0,827	0,658	0,827	0,513	1,0	0,513
Faith PD	0,827	0,827	0,513	0,513	1,0	0,827
Shannon	0,827	0,275	0,827	0,827	0,564	0,513
Bray-Curtis	0,272	0,186	0,592	0,106	0,108	0,107
Jaccard	0,216	0,694	0,694	0,095	0,303	0,106
Weighet UniFrac	0,705	0,173	1,0	0,200	0,213	0,181
Unweighed UniFrac	0,190	0,897	0,596	0,092	0,293	0,206

4.2.2 CARPATUS®

4.2.2.1 Fréquence relative des OTUs

La figure 23, présentée sous forme d'histogramme cumulé (bar plot), illustre la fréquence relative des OTUs au niveau du genre pour les échantillons CARPATUS®, chacun d'eux étant présenté individuellement avec ses répétitions. Les légendes des bar plots en figure 24 illustrent les 34 OTUs les plus fréquents.

Cette figure permet d'affirmer que, de manière générale, les échantillons possèdent un microbiote bactérien assez similaire. Toutefois, un enrichissement notable du genre bactérien *Anaeromyxobacter* est observé dans les échantillons traités avec des doses élevées d'herbicides. Cette espèce représente le deuxième genre bactérien le plus fréquent à la temporalité 3.

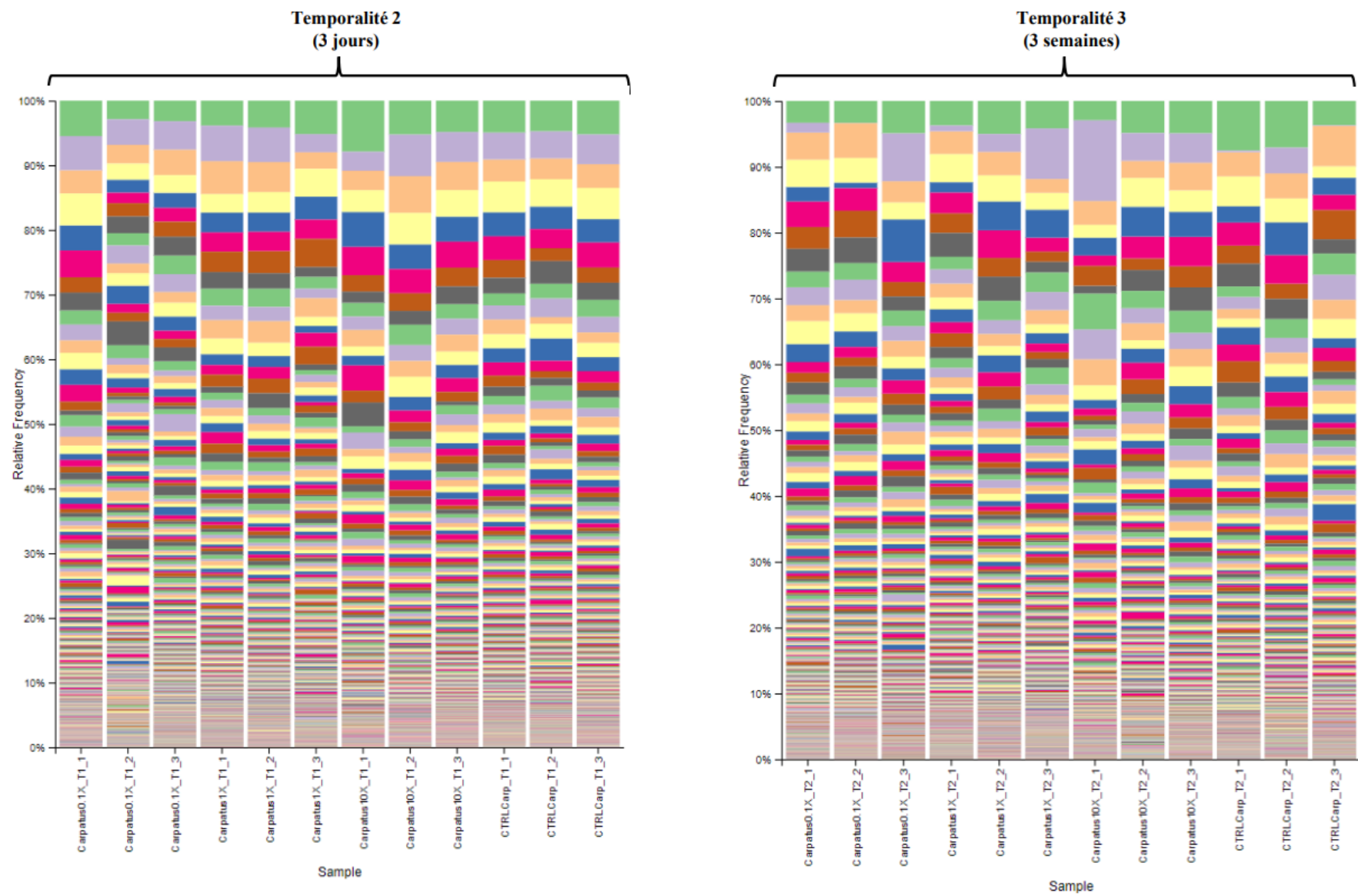


Figure 23: Bar plot des fréquences relatives des genres bactériens de chaque échantillon de l'herbicide CARPATUS® aux temporalités 2 et 3.

Temporalité 2 (3 jours)

d_Bacteria:p_Acidobacteriota;o_Vicinamibacteria;o_Vicinamibacteriales:f_uncultured;g_uncultured
d_Bacteria:p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Burkholderiales:f_SC-I-84;g_SC-I-84
d_Bacteria:p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Burkholderiales:f_Nitrosomonadaceae;g_MND1
d_Bacteria:p_Myxococcota;c_Polyangia;o_Haliangiales:f_Haliangiaceae;g_Haliangium
d_Bacteria:p_Acidobacteriota;o_Vicinamibacteria;o_Vicinamibacteriales:f_Vicinamibacteraceae;g_Vicinamibacteraceae
d_Bacteria:p_Acidobacteriota;o_Subgroup_5;o_Subgroup_5:f_Subgroup_5;g_Subgroup_5
d_Bacteria:p_Gemmatimonadota;c_Gemmatimonadetes;o_Gemmatimonadales:f_Gemmatimonadaceae;g_uncultured
d_Bacteria:p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Burkholderiales:f_Nitrosomonadaceae;g_Ellin6067
d_Bacteria:p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Burkholderiales:f_TRA3-20;g_TRA3-20
d_Bacteria:p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Burkholderiales:f_Comamonadaceae;g_uncultured
d_Bacteria:p_Methylomirabilota;c_Methylomirabilia;o_Rokubacteriales:f_Rokubacteriales;g_Rokubacteriales
d_Bacteria:p_Bacteroidota;c_Bacteroidia;o_Chitinophagales:f_Chitinophagaceae;g_uncultured
d_Bacteria:p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Xanthomonadales:f_Xanthomonadaceae;g_Arenimonas
d_Bacteria:p_Acidobacteriota;c_Blastocatellia;o_Pyrinomonadales:f_Pyrinomonadaceae;g_RB41
d_Bacteria:p_Nitrospirata;c_Nitrospira;o_Nitrospirales:f_Nitrospiraceae;g_Nitrospira
d_Bacteria:p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Burkholderiales:f_Oxalobacteraceae;g_Massilia
d_Bacteria:p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Burkholderiales:f_Comamonadaceae;g_Ramlibacter
d_Bacteria:p_Acidobacteriota;o_Holophagae;o_Subgroup_7;f_Subgroup_7;g_Subgroup_7
d_Bacteria:p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Xanthomonadales:f_Xanthomonadaceae;g_Lysobacter
d_Bacteria:p_Acidobacteriota;o_Subgroup_25;o_Subgroup_25:f_Subgroup_25;g_Subgroup_25
d_Bacteria:p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Bacillales:f_Bacillaceae;g_Bacillus
d_Bacteria:p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Burkholderiales:f_A21b;g_A21b
d_Bacteria:p_Acidobacteriota;o_Acidobacteriales;o_Solibacterales:f_Solibacteraceae;g_Candidatus_Solibacter
d_Bacteria:p_Acidobacteriota;o_Acidobacteriales;o_Acidobacteriales:f_uncultured;g_uncultured
d_Bacteria:p_Myxococcota;c_bacteriap25;o_bacteriap25:f_bacteriap25;g_bacteriap25
d_Bacteria:p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Gammaproteobacteria;Incertae_Sedis:f_Unknown_Family;g_Acidibacter
d_Bacteria:p_Planctomycetota;c_Pla4_lineage;o_Pla4_lineage:f_Pla4_lineage;g_Pla4_lineage
d_Bacteria:p_Acidobacteriota;o_Acidobacteriales;o_Bryobacteriales:f_Bryobacteraceae;g_Bryobacter
d_Bacteria:p_Bacteroidota;c_Bacteroidia;o_Chitinophagales:f_Saprosiraceae;g_uncultured
d_Bacteria:p_Acidobacteriota;o_Vicinamibacteria;o_Subgroup_17;f_Subgroup_17;g_Subgroup_17
d_Bacteria:p_Proteobacteria;o_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales:f_Xanthobacteraceae;g_uncultured
d_Bacteria:p_Desulfobacterota;o_uncultured;o_uncultured:f_uncultured;g_uncultured
d_Bacteria:p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Burkholderiales:f_Nitrosomonadaceae;g_IS-44
d_Bacteria:p_Acidobacteriota;o_Thermoanaerobaculia;o_Thermoanaerobaculiales:f_Thermoanaerobaculaceae;g_Subgroup_10

Temporalité 3 (3 semaines)

d_Bacteria:p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Burkholderiales:f_SC-I-84;g_SC-I-84
d_Bacteria:p_Myxococcota;c_Myxococcia;o_Myxococcales:f_Anaeromyxobacteraceae;g_Anaeromyxobacter
d_Bacteria:p_Acidobacteriota;o_Vicinamibacteria;o_Vicinamibacteriales:f_uncultured;g_uncultured
d_Bacteria:p_Myxococcota;c_Polyangia;o_Haliangiales:f_Haliangiaceae;g_Haliangium
d_Bacteria:p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Burkholderiales:f_Comamonadaceae;g_Ramlibacter
d_Bacteria:p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Burkholderiales:f_Nitrosomonadaceae;g_MND1
d_Bacteria:p_Acidobacteriota;o_Vicinamibacteria;o_Vicinamibacteriales:f_Vicinamibacteraceae;g_Vicinamibacteraceae
d_Bacteria:p_Acidobacteriota;o_Subgroup_5;o_Subgroup_5:f_Subgroup_5;g_Subgroup_5
d_Bacteria:p_Methylomirabilota;c_Methylomirabilia;o_Rokubacteriales:f_Rokubacteriales;g_Rokubacteriales
d_Bacteria:p_Gemmatimonadota;c_Gemmatimonadetes;o_Gemmatimonadales:f_Gemmatimonadaceae;g_uncultured
d_Bacteria:p_Nitrospirata;c_Nitrospira;o_Nitrospirales:f_Nitrospiraceae;g_Nitrospira
d_Bacteria:p_Acidobacteriota;c_Blastocatellia;o_Pyrinomonadales:f_Pyrinomonadaceae;g_RB41
d_Bacteria:p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Burkholderiales:f_TRA3-20;g_TRA3-20
d_Bacteria:p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Burkholderiales:f_Nitrosomonadaceae;g_Ellin6067
d_Bacteria:p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Burkholderiales:f_Comamonadaceae;g_uncultured
d_Bacteria:p_Bacteroidota;c_Bacteroidia;o_Chitinophagales:f_Chitinophagaceae;g_uncultured
d_Bacteria:p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Bacillales:f_Bacillaceae;g_Bacillus
d_Bacteria:p_Acidobacteriota;o_Subgroup_25;o_Subgroup_25:f_Subgroup_25;g_Subgroup_25
d_Bacteria:p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Xanthomonadales:f_Xanthomonadaceae;g_Arenimonas
d_Bacteria:p_Acidobacteriota;o_Holophagae;o_Subgroup_7;f_Subgroup_7;g_Subgroup_7
d_Bacteria:p_Myxococcota;c_bacteriap25;o_bacteriap25:f_bacteriap25;g_bacteriap25
d_Bacteria:p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Burkholderiales:f_A21b;g_A21b
d_Bacteria:p_Desulfobacterota;o_uncultured;o_uncultured:f_uncultured;g_uncultured
d_Bacteria:p_Acidobacteriota;o_Acidobacteriales;o_Solibacterales:f_Solibacteraceae;g_Candidatus_Solibacter
d_Bacteria:p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales:f_Xanthobacteraceae;g_uncultured
d_Bacteria:p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Xanthomonadales:f_Xanthomonadaceae;g_Lysobacter
d_Bacteria:p_Acidobacteriota;o_Acidobacteriales;o_Acidobacteriales:f_uncultured;g_uncultured
d_Bacteria:p_Planctomycetota;c_Pla4_lineage;o_Pla4_lineage:f_Pla4_lineage;g_Pla4_lineage
d_Bacteria:p_NB1-j;o_NB1-j;o_NB1-j:f_NB1-j;g_NB1-j
d_Bacteria:p_Acidobacteriota;o_Acidobacteriales;o_Bryobacteriales:f_Bryobacteraceae;g_Bryobacter
d_Bacteria:p_Planctomycetota;c_OM190;o_OM190:f_OM190;g_OM190
d_Bacteria:p_Acidobacteriota;o_Vicinamibacteria;o_Subgroup_17;f_Subgroup_17;g_Subgroup_17
d_Bacteria:p_Acidobacteriota;c_Blastocatellia;o_11-24;f_11-24;g_11-24
d_Bacteria:p_Acidobacteriota;o_Thermoanaerobaculia;o_Thermoanaerobaculiales:f_Thermoanaerobaculaceae;g_Subgroup_10

Figure 24: Légende des bar plot des fréquences relatives des genres bactériens de chaque échantillon de l'herbicide CARPATUS® aux temporalités 2 et 3.

4.2.2.2 Analyse de la diversité alpha et beta

Les tests statistiques de la diversité alpha montrent des différences significatives dans la temporalité 3 entre les échantillons à la dose 10x et la dose contrôle, selon les indices Observed Features, Faith PD et Shannon. Dans la temporalité 2, une différence significative est observée entre la dose 1x et la dose contrôle avec l'indice Faith PD. En revanche, aucune différence significative n'est observée pour la dose 10x à la temporalité 2, pour la dose 1x à la temporalité 3, ainsi que pour la dose 0,1x aux deux temporalités (Tableau 3).

Tableau 3: *p*-valeur de l'analyse de la diversité alpha et bêta, pour l'herbicide CARPATUS® à chaque dose de chaque temporalité, comparée à la dose contrôle. Une *p*-valeur < 0,5 indique une différence significative.

Indice de diversité	p-valeur					
	Temporalité 2			Temporalité 3		
	Dose 10x	Dose 1x	Dose 0,1x	Dose 10x	Dose 1x	Dose 0,1x
Observed features	0,127	0,275	0,513	0,0495	0,275	0,827
Faith PD	0,127	0,0495	0,513	0,0495	0,513	0,827
Shannon	0,513	0,827	0,275	0,0495	0,513	0,513
Bray-Curtis	0,211	0,105	0,513	0,405	0,602	0,481
Jaccard	0,197	0,102	0,403	0,515	0,314	0,271
Weighted UniFrac	0,201	0,215	0,305	0,512	0,602	0,699
Unweighted UniFrac	0,183	0,102	0,202	0,194	0,089	0,111

La figure 25 présente les box plots des indices de diversité alpha bactérienne à la temporalité 3, comparant la dose 10x à la dose témoin. Les échantillons témoins montrent une richesse, une diversité et une abondance bactériennes plus élevées par rapport à ceux traités avec la dose 10x.

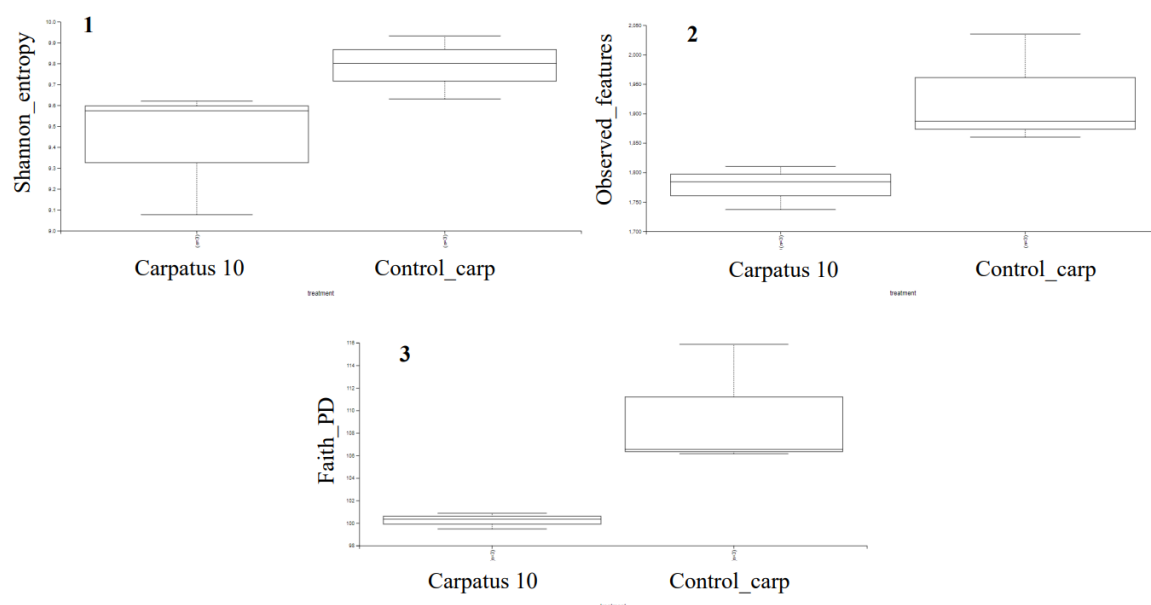


Figure 25: Box plot des indices de diversité alpha bactérienne pour l'herbicide CARPATUS® à la temporalité 3, comparant la dose 10x à la dose témoin. Les indices de diversité sont : 1 = Shannon, 2 = Observed Features, 3 = Faith PD (Carpatus10 = dose 10x, Control_carp = dose contrôle).

La figure 26 présente le box plot de l'indice de diversité alpha bactérienne à la temporalité 2, comparant la dose 1x à la dose témoin. Les échantillons traités à la dose 1x montre une diversité bactérienne plus élevée par rapport à ceux de la dose contrôle pour la métrique Faith PD.

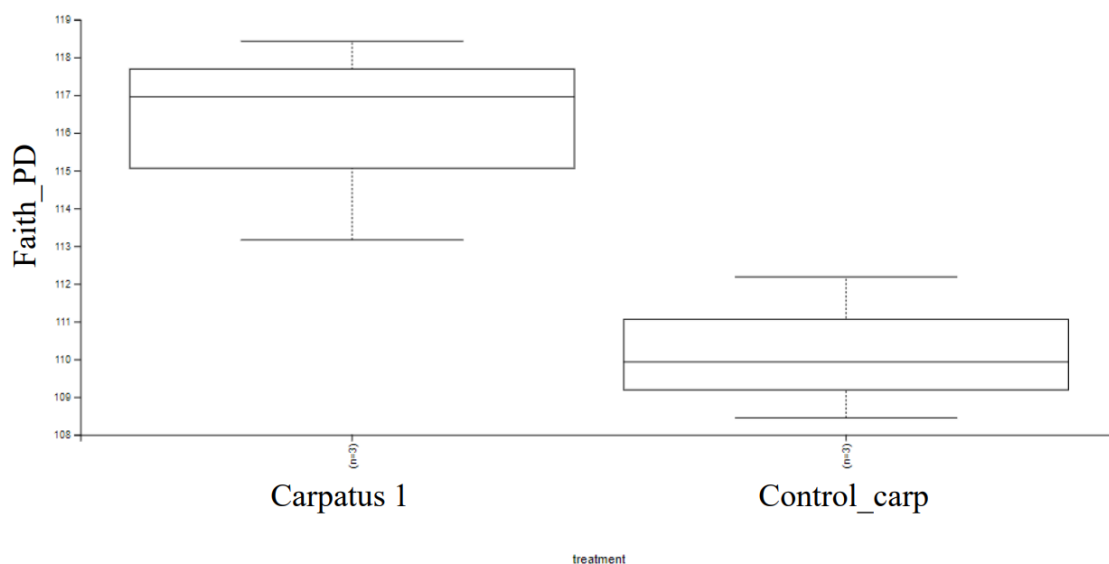


Figure 26: Box plot de l'indice de diversité alpha Faith PD bactérienne pour l'herbicide CARPATUS® à la temporalité 2, comparant la dose 1x à la dose témoin (Carpatus1 = dose 1x, Control_carp = dose contrôle).

4.2.2.3 Analyse d'abondance différentielle

Des différences significatives ayant été observées, une analyse plus approfondie a été réalisée pour identifier les genres bactériens enrichis ou appauvris dans les échantillons traités avec la dose 10x et 1x par rapport à ceux de la dose contrôle.

L'analyse a révélé cinq genres enrichis et trois genres appauvris à la dose 10x par rapport à la dose contrôle ($\alpha = 0,01$) (Figure 27).

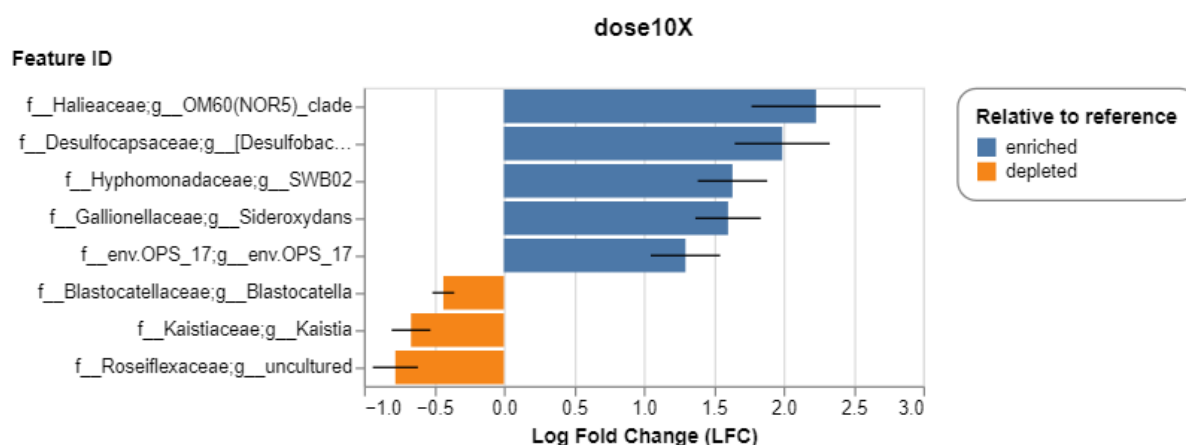


Figure 27: Genres bactériens enrichis ou appauvris dans les échantillons traités avec la dose 10x par rapport à ceux de la dose contrôle.

L'analyse a révélé deux genres enrichis et 31 genres appauvris à la dose 1x par rapport à la dose contrôle (alpha = 0,01) (Figure 28).

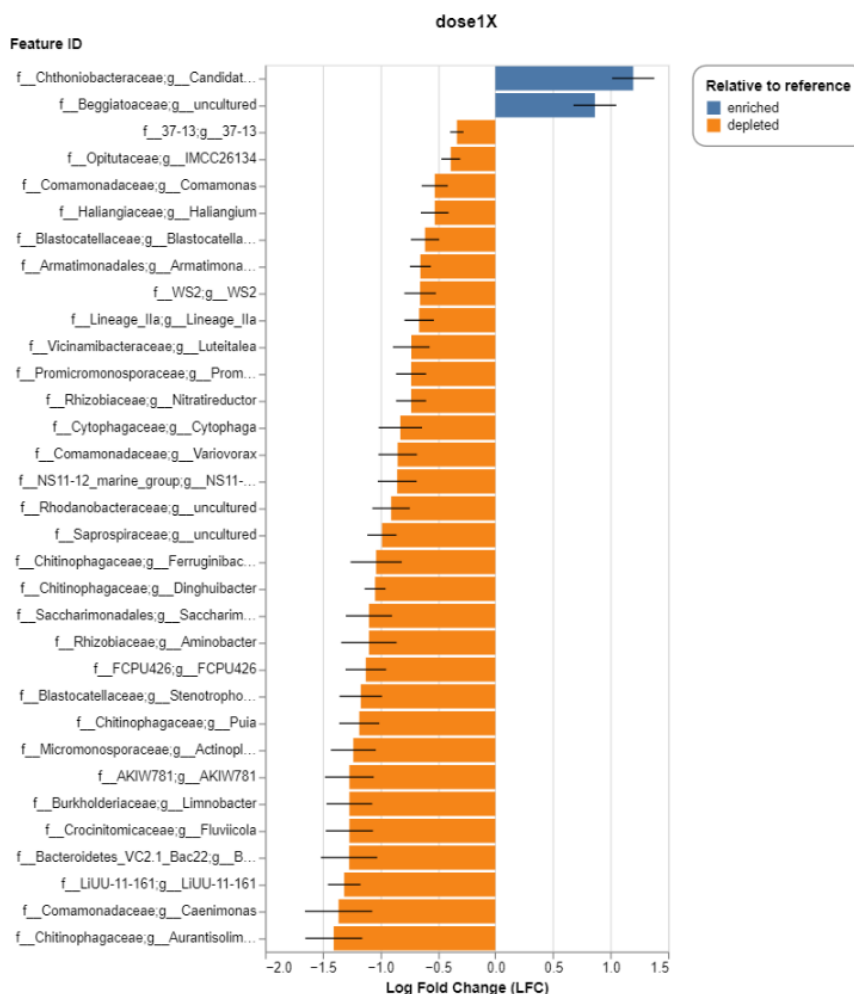


Figure 28: Genres bactériens enrichis ou appauvris dans les échantillons traités avec la dose 1x par rapport à ceux de la dose contrôle.

Une analyse bibliographique complémentaire a été réalisée sur les genres bactériens enrichis et appauvris aux doses 10x et 1x par rapport à la dose de contrôle, afin d'examiner leurs fonctions dans le sol et dans l'eau. Bien qu'aucune fonction similaire ne se démarque de manière uniforme, un large éventail de fonctions biologiques est tout de même affecté. Par exemple, l'oxydation de composés chimiques est effectuée par le genre *Sideroxydans*, capable d'oxyder le Fer (III), tandis que des genres comme *Desulfobacterium* et *Comamonas* jouent un rôle clé dans la bioremédiation. Les résultats détaillés de cette analyse se trouvent en annexe 9

5 Discussion

5.1 Effet de l'application de l'herbicide FUEGO® sur l'activité, la respiration et la biomasse microbienne ainsi que sur les communautés bactériennes

L'activité et la respiration microbienne, bien que constituant des paramètres globaux ne fournissant pas de bioindicateurs spécifiques, sont cruciales pour évaluer la qualité des sols et comprendre leur fonctionnement global (Pathak et al., 2005; Thibault et al., 2018).

L'activité enzymatique FDA augmente au fil du temps, avec une hausse plus marquée pour l'application des doses 1x et 10x comparé à la dose contrôle et à la dose 0,1x (Figure 8). Ces résultats contrastent avec ceux de Hussain et al., (2009), qui ont observé que divers pesticides, dont le Carbendazim, le Carbofuran et le Glyphosate, réduisaient significativement les activités enzymatiques du sol, telles que celles de la nitrogénase, de la déshydrogénase, de l'uréase et de la phosphatase. De même, Darine et al., (2015) ont constaté une diminution significative des activités de la fluorescéine-diacétate hydrolase lors de l'application de fortes doses de Fusilade Forte™, contenant du Fluzifop-P-butyl comme substance active. L'augmentation de l'activité enzymatique observée avec l'herbicide FUEGO® dans cette étude pourrait alors valider les hypothèses Johnsen et al., (2001) et de Cycoń et al., (2013) selon lesquelles certains organismes peuvent utiliser les pesticides comme source d'énergie et de nutriments, favorisant ainsi leur croissance et leur activité. Cycoń et al., (2013) ont effectivement observé une stimulation de l'activité de l'uréase dans les sols traités avec la substance active napropamide à la dose agronomique et à la dose 10 fois supérieure.

La respiration microbienne, quant à elle, a été impactée immédiatement après l'application de l'herbicide. En effet, dans les trois heures suivant l'application, les microcosmes traités ont présenté un taux d'émission de CO₂ inférieur à celui des contrôles (Figure 11). Un même phénomène a été observé dans plusieurs études, notamment celle de Cycoń et al., (2013), qui ont noté une réduction significative de la biomasse bactérienne et fongique le premier jour d'application de la substance active napropamide par rapport au témoin. Cependant, dans cette étude, après trois semaines, l'échantillon traité à la dose 0,1x émet plus de CO₂ qu'aux doses contrôle et 1x, ces derniers présentant toutefois un taux d'émission plus élevé qu'à la dose 10x. Cela suggère qu'une faible dose d'herbicide pourrait stimuler l'activité des microorganismes, tandis qu'une dose élevée reste trop inhibitrice. De fait, dans la littérature, Megharaj et al., (1999) montrent que l'augmentation des activités enzymatiques de la déshydrogénase à de

faibles concentrations de pesticides pourrait être due à l'utilisation de certains pesticides, tels que le DDT ou de leurs métabolites comme source de carbone ou d'énergie pour des microorganismes spécifiques, stimulant ainsi leur croissance et leur activité enzymatique. Cette dynamique influence directement la minéralisation du carbone et le taux de CO₂ émis. Garcia et al., (1997) ont montré que l'augmentation de l'activité de la déshydrogénase est bien corrélée avec la respiration basale, qui est le taux de CO₂ produit par les microorganismes. Cependant, après trois mois, aucune différence significative n'est observée, mais le taux d'émission est nettement plus élevé qu'après 3 semaines. Cela pourrait être dû à la dégradation de l'herbicide, puisque l'augmentation est également observée dans les échantillons contrôles. En effet, la demi-vie de FUEGO® est de 19 à 82 jours (Baćmaga et al., 2014), suggérant que l'herbicide pourrait être dégradé avec le temps, rendant les microorganismes moins impactés et donc plus actifs.

L'effet de l'herbicide ne montre donc pas exactement les mêmes tendances sur l'activité et la respiration microbienne. Bien qu'ils soient complémentaires, ces tests n'impactent pas les mêmes fonctions. Le test Microresp™ quantifie la respiration microbienne en mesurant la minéralisation du carbone à travers l'émission de CO₂ (µg CO₂-C/g/h) (Rowell, 1995), tandis que les enzymes responsables de l'hydrolyse de la FDA, telles que les estérases, protéases et lipases, mesurent l'activité globale dans le sol (Adam et al., 2001). Il est donc possible que certaines activités impliquées dans la minéralisation du carbone soient masquées dans le test enzymatique FDA, expliquant ainsi les divergences de résultats.

Concernant la biomasse fongique, aucune différence n'est observée après trois jours. Cependant, après trois semaines, la biomasse fongique est enrichie à la dose 1x et réduite à la dose 10x comparativement au témoin. Après trois mois, les différences entre les doses s'estompent, bien que la figure 15 montre que tous les échantillons traités présentent une biomasse fongique inférieure à celle du contrôle, indiquant un impact de l'herbicide. Baćmaga et al., (2014) ont également observé une diminution de la diversité et du développement des champignons en présence de métazachlore, la substance active du FUEGO®. Cependant, leur étude révèle une diminution plus marquée avec la dose la plus élevée, tandis que cette étude indique un impact similaire pour toutes les doses. Finalement, aucun impact significatif n'a été relevé sur la biomasse bactérienne. Cela pourrait être dû au mode d'action du métazachlore, qui agit principalement comme un inhibiteur des enzymes végétales en perturbant le processus de division cellulaire (Baćmaga et al., 2014; Karier et al., 2017). Les champignons, étant des

eucaryotes, pourraient être plus sensibles à cette perturbation, ce qui expliquerait l'impact observé sur leur biomasse.

Le séquençage nanopore a été utilisé pour évaluer l'impact des herbicides FUEGO® et CARPATUS® sur la structure des communautés bactériennes, dans le but d'identifier des indicateurs microbiens indiquant la présence de ces herbicides. Ce type de séquençage est avantageux en raison de son coût réduit pour la préparation des échantillons et des partenariats avec le CEBEDEAU. Contrairement aux méthodes de séquençage traditionnelles, il permet de séquencer l'ensemble du 16S et simplifie l'assemblage du génome entier grâce à de longs reads. La qualité du séquençage nanopore s'améliore constamment en offrant des résultats supérieurs grâce aux avancées dans la chimie utilisée, le modèle de basecalling et, dans cette étude, l'utilisation de la pipeline PRONAME (Branton et al., 2008; Dubois et al., 2024). Cependant, la figure 20 montre que la qualité du séquençage dans la présente étude est faible, avec des scores de qualité Phred compris entre Q10 et Q15, indiquant un taux d'erreur relativement élevé. Cette faible qualité est probablement due à l'utilisation d'une chimie ancienne ou d'une flow cell dépassée. Actuellement, Oxford Nanopore Technologies propose la version R10.4.1 de la flow cell ("Flow Cell (R10.4.1)," August-2-2024), qui offre une précision améliorée par rapport à la version R9.4.1 utilisée dans cette étude. Une amélioration possible aurait été d'utiliser une flow cell plus récente et une chimie plus avancée, afin de travailler avec des reads duplex et d'augmenter la précision du séquençage.

Les résultats montrent que l'herbicide FUEGO® n'a pas d'effet significatif sur la structure des communautés bactériennes, que ce soit trois jours ou trois semaines après application, et ce, quelle que soit la dose. Cette absence d'effet pourrait s'expliquer par une faible persistance de l'herbicide dans le sol. Baćmaga et al., (2014) ont constaté que cet herbicide se dégrade généralement rapidement, avec une demi-vie considérée comme rapide à modérée (Baćmaga et al., 2014). Cette hypothèse rejoint alors les observations de Terol et al., (2024), qui n'ont pas observé d'impact significatif de l'herbicide triketone-β dans les communautés bactériennes en raison de sa faible persistance dans le sol. De plus, Beulke et al. (2001) ont montré que les conditions environnementales, telles que le type de sol, la température et l'humidité, jouent un rôle crucial dans la dégradation des pesticides, réduisant ainsi la sensibilité des microorganismes aux effets néfastes de la substance active. Il est aussi pertinent de considérer qu'après trois jours d'incubation, l'ADN de bactéries mortes pourrait encore être présent dans les échantillons. Cette présence pourrait expliquer l'absence de différence significative dans les communautés bactériennes à ce stade. En effet, les débris cellulaires des bactéries mortes

pourraient limiter la détection des changements réels dans la structure des communautés bactériennes à ce moment- là.

5.2 Effet de l'application de l'herbicide CARPATUS® sur l'activité, la respiration et la biomasse microbienne ainsi que sur les communautés bactériennes

Pour l'herbicide CARPATUS®, bien que l'activité enzymatique augmente, cette augmentation est également observée dans les doses contrôles (Figure 10), ce qui suggère que l'herbicide n'a pas d'impact significatif sur l'activité enzymatique FDA. Cette observation contraste avec les résultats de l'étude menée par Carpio et al., (2020), où l'application du HEROLD®, qui est un herbicide contenant les mêmes substances actives que le CARPATUS® (flufénacet, diflufenican), a montré une diminution significative de l'activité microbienne pour des doses cinq fois supérieures à la dose recommandée. Une explication possible de ces résultats divergents réside dans les conditions spécifiques à leur étude. En effet, ceux-ci ont travaillé en champs plutôt qu'en microcosmes. Effectivement, comme le souligne la littérature, les facteurs environnementaux peuvent fortement influencer la persistance de l'herbicide dans le sol (Edwards, 1975). De plus, Carpio et al., (2020) ont effectué leurs observations jusqu'à 339 jours après l'application des herbicides. Le diflufenican étant très persistant dans le sol (Tiryaki et al., 2010), ses effets peuvent se manifester plus tard, alors que la présente étude s'est arrêtée à trois mois. Une autre explication possible de la différence observée pourrait être liée à l'influence des coformulants. Dans certains cas, ce sont les coformulants qui peuvent être plus toxiques que la substance active elle-même. Par exemple, une étude sur les herbicides à base de glyphosate a révélé que le RangerPro®, un herbicide contenant le glyphosate et le coformulant POE-15 tallow amine, était beaucoup plus toxique que le glyphosate seul (Mesnage et al., 2022)

En ce qui concerne la respiration microbienne, un impact direct de l'herbicide est observé : les microcosmes traités présentent un taux d'émission de CO₂ inférieur à celui des contrôles dans les trois heures suivant l'application (Figure 13). Cependant, cet effet s'estompe par la suite, et aucune différence significative n'est observée entre les échantillons contrôles et traités à partir de trois jours et jusqu'à trois mois. Cela suggère que, dans ces conditions expérimentales, l'application de CARPATUS® n'a pas d'impact significatif sur la respiration microbienne. Dans ce cas-ci, l'activité et la respiration microbienne suivent une tendance similaire après l'application de l'herbicide, en ne réagissant pas ou peu à celle-ci.

Concernant la biomasse fongique, un impact négatif est observé dès trois jours après l'application de l'herbicide (figure 17). Cet effet s'estompe cependant avec le temps, et après trois mois, les échantillons traités affichent une biomasse fongique légèrement supérieure à celle du contrôle, bien que le test de Tukey n'ait pas révélé de différences significatives. Ces résultats s'alignent sur ceux de Cycoń et al., (2013) concernant le napropamide, où ils ont observé que la biomasse totale, bactérienne et fongique, est significativement réduite dans les sols traités, surtout le premier jour après l'application, mais qu'elle augmente à la fin de l'expérience, suggérant une possible utilisation des nutriments libérés par les cellules microbiennes mortes. Ces observations concordent également avec celles de Crouzet et al., (2010) et Zabaloy et al., (2010), qui ont noté une augmentation de la quantité de champignons après l'application de désherbants. De plus, Baćmaga et al., (2015) ont également observé une augmentation du développement des champignons après l'ajout d'un herbicide contenant du diflufenican.

Concernant la biomasse bactérienne, l'ANOVA montre un impact de la dose d'herbicide appliquée, et la figure 19 montre une augmentation de la biomasse bactérienne pour les échantillons traités par rapport au contrôle, même si le test de Tukey n'a pas révélé de différences significatives. Ces résultats rejoignent ceux de Baćmaga et al., (2015), qui ont observé que l'herbicide contenant du diflufenican stimule la croissance de divers groupes de bactéries, y compris les bactéries organotrophes et les actinomycètes.

Visuellement, la figure 23 révèle un enrichissement notable du genre bactérien *Anaeromyxobacter* aux doses 1x et 10x, tandis qu'il semble s'appauvrir ou disparaître aux doses 0,1x et dans les échantillons contrôles. Le genre *Anaeromyxobacter* joue un rôle crucial dans la réduction du Fe(III) (Iftikhar et al., 2021). Bien que sa fonction métabolique soit encore peu documentée en raison du nombre limité d'isolats, il pourrait également contribuer à la bioremédiation des métaux lourds, des métaux radioactifs et de la pollution par les halogénures organiques (Wang et al., 2020). Les résultats pour la temporalité 4, correspondant à trois mois d'incubation, n'étant pas encore disponibles, il est difficile de déterminer si ce genre bactérien pourrait servir de biomarqueur potentiel. L'analyse des données de cette temporalité pourrait éventuellement indiquer si l'enrichissement persiste ou si cet effet diminue avec le temps.

Les tests statistiques d'alpha diversité révèlent des effets significatifs de l'herbicide appliqué à la dose 1x sur la diversité phylogénétique des communautés bactériennes du sol, observés après trois jours d'application. En revanche, après trois semaines, les différences entre les échantillons traités et les contrôles ne sont plus significatives, ce qui pourrait indiquer une

stabilisation des communautés bactériennes. Parallèlement, l'application de l'herbicide à une dose 10x montre également un effet significatif sur la diversité phylogénétique, la richesse et l'abondance bactérienne, qui sont toutes réduites dans les échantillons traités par rapport aux témoins après trois semaines d'application. Il sera important de considérer les résultats obtenus après trois mois pour déterminer si ces différences significatives se maintiennent ou s'atténuent avec le temps. L'étude de Terol et al., (2024) montre que la richesse bactérienne totale et la diversité phylogénétique fluctuent au fil du temps. D'un côté, ils observent que la dose 10x de tembotrione, substance active du PESTANAL[®], augmente la richesse et la diversité globale des communautés bactériennes, probablement en raison de l'émergence de populations bactériennes dégradantes capables d'utiliser cet herbicide comme source d'énergie. Cependant, en se focalisant sur le 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD), une enzyme clé impliquée dans le métabolisme de la tyrosine, ils notent une diminution de la richesse et de la diversité phylogénétique, indiquant un possible effet toxique direct sur les organismes sensibles.

Cela souligne l'importance d'examiner des groupes fonctionnels bactériens spécifiques, en plus de la diversité taxonomique, car les conclusions sur l'effet d'un polluant sur les populations bactériennes peuvent varier en fonction des groupes étudiés. Cela est confirmé par l'étude de Darine et al., (2015) sur l'herbicide Fusilade Forte[™], qui a observé une stimulation de bactéries réductrices de sulfate, telles que *Desulfomicrobium thermophilum* et *Desulfocella halophila*, ainsi que des oxydants de soufre, tels que *Thiobacillus* et *Halothiobacillus*. Dans le cadre de cette étude, cette piste a été explorée en annexe 9, où les fonctions des différents genres bactériens enrichis et appauvris aux doses 1x et 10x par rapport à la dose contrôle ont été analysées. L'objectif était de déterminer si le CARPATUS[®] exerçait un impact systématique sur des genres bactériens ayant des fonctions similaires dans le sol. Parmi les genres identifiés, certains sont impliqués dans des processus tels que la réduction du sulfate (*Desulfobacterium*), l'oxydation du fer (*Sideroxydans*), ou encore la réduction du nitrate (*Nitratreductor*). Cependant, aucune fonction spécifique récurrente n'a été observée, écartant ainsi l'hypothèse d'un biomarqueur lié à une fonction systématiquement affectée par l'herbicide.

5.3 Mise au point d'un outil de diagnostic

Il est crucial de noter que l'échantillonnage du sol pour les deux herbicides, bien que réalisé sur la même parcelle, n'a pas été effectué simultanément. Comme le souligne Edwards, (1975), la persistance des pesticides est influencée par divers facteurs tels que la température, l'humidité, et les propriétés spécifiques du sol. Pour établir des comparaisons rigoureuses entre différents traitements, il aurait été préférable de réaliser les prélèvements en même temps. Cependant, bien qu'une analyse rapide des figure 21 et figure 23 montre que les communautés bactériennes des témoins de FUEGO® et CARPATUS® sont assez similaires, il a été décidé d'étudier leurs impacts séparément.

L'objectif principal de ce mémoire était de développer des indicateurs microbiens pour évaluer l'impact des herbicides FUEGO® (metazachlore) et CARPATUS® (diflufenican, flufenacet) sur les communautés microbiennes du sol. Dans ce contexte, plusieurs pistes ont été explorées, notamment l'identification de genres bactériens ou de fonctions spécifiques affectés par ces herbicides. Cependant, ces investigations n'ont pas permis de définir de bioindicateur précis. La littérature montre que les indicateurs utilisés pour évaluer l'impact des herbicides sur les sols sont variés et ne reposent pas nécessairement sur des biomarqueurs spécifiques dans un organisme défini, qu'il soit vertébré ou invertébré (Domingues et al., 2010). Par exemple, Thiour-Mauprivez et al., (2019) ont étudié la dioxygénase 4-hydroxyphénylpyruvate (4-HPPD), l'enzyme ciblée par les herbicides β -tricétones, présente dans tous les règnes vivants. Ils suggèrent que cette enzyme pourrait être un bon biomarqueur d'exposition à ces herbicides. Leur étude propose d'utiliser des enzymes microbiennes spécifiquement ciblées par les herbicides pour développer des biomarqueurs moléculaires, en mesurant par exemple les activités enzymatiques. Ces dernières sont largement reconnues comme des indicateurs fiables de la qualité des sols en raison de leur sensibilité au stress environnemental et de leur réactivité rapide (Gil-Sotres et al., 2005; Moscatelli et al., 2012; Schlöter et al., 2018).

Au vu des résultats de ce travail, il semble pertinent de développer un bioindicateur basé non pas sur un unique paramètre, mais en combinant divers paramètres pour évaluer la qualité des sols. Il serait alors nécessaire d'étudier des enzymes impliquées dans des fonctions spécifiques qui réagissent à l'ajout des herbicides étudiés. La littérature mentionne des enzymes telles que les déshydrogénases, l'uréase, l'arylsulfatase, la β -glucosidase et les phosphatases comme étant affectées par ces herbicides (Baćmaga et al., 2014, 2015). Des chercheurs tels que Megharaj et al., (1999) et Yang Gao et al., (2009) ont observé que l'activité de ces enzymes est un indicateur utile de l'activité microbienne globale. En pratique, des tests existent déjà pour analyser par

exemple le glyphosate dans les eaux, utilisant une méthode d'immuno-essai sur membrane (ELISA) qui cible un épitope de la molécule de glyphosate (Nahar et al., 2013).

Dans le cadre du projet MICROSENSE, visant à créer un outil dynamique et fonctionnel pour analyser quantitativement et qualitativement la dynamique et le fonctionnement des communautés microbiennes, il pourrait être intéressant de développer un système inspiré du Biolog[®], mais adapté pour étudier les activités enzymatiques affectées par les herbicides. Le système de type Biolog[®] est une méthode utilisée pour évaluer l'activité métabolique des microorganismes à l'aide de plaques contenant divers substrats carbonés. Les microorganismes métabolisent ces substrats, ce qui entraîne la réduction d'un colorant, le faisant passer d'incolore à violet, permettant ainsi de mesurer la diversité et l'activité microbienne (Stefanowicz, 2006).

La première étape serait d'identifier les enzymes systématiquement impactées par les herbicides étudiés. Pour cela, des analyses transcriptomiques pourraient être pertinentes afin de détecter les changements dans l'expression génique après l'application des herbicides (Pant, 2024). Une fois les enzymes critiques identifiées, un système de type Biolog[®] spécifique pourrait être développé, avec des substrats correspondant aux activités enzymatiques affectées par les herbicides. Ce système permettrait de détecter directement si le sol est contaminé par ces herbicides ou non.

Enfin, une autre piste à explorer dans le cadre du projet MICROSENSE pourrait être l'utilisation de bioindicateurs fongiques plutôt que bactériens. En effet, les champignons sont souvent considérés comme d'excellents bioindicateurs environnementaux en raison de leur large distribution, de leurs rôles écologiques variés, de leur grande diversité biologique, et de leur sensibilité accrue aux variations de l'environnement (Warnasuriya et al., 2023). Dans cette étude, les champignons ont montré une sensibilité marquée à l'ajout des herbicides, suggérant qu'ils pourraient constituer une piste de recherche intéressante à explorer.

6 Contribution personnelle

Ce travail s'inscrit dans le cadre du projet MICROSENSE, qui vise à développer un outil dynamique pour analyser en quantité et en qualité la dynamique des communautés microbiennes dans les échantillons environnementaux, afin de trouver des bioindicateurs attestant la présence de pesticides dans l'environnement.

Dans le cadre de ce projet, j'ai réalisé de nombreuses manipulations, à la fois dans les laboratoires de la Quintinie au CRA-W et dans ceux de la faculté, en biologie végétale. J'ai conçu le dispositif expérimental de ce travail, en concertation avec mes promoteurs, en choisissant les herbicides à étudier, les différentes doses et temporalités à appliquer, ainsi que les concentrations par dose.

Dans un premier temps, j'ai collecté les échantillons de sol utilisés pour les analyses d'activité, de respiration et de biomasse microbienne. J'ai également utilisé ces échantillons pour les analyses de la diversité microbienne. J'ai réalisé l'ensemble des manipulations, à l'exception du séquençage, auquel je n'ai assisté qu'une fois.

J'ai effectué les analyses statistiques des activités, de la respiration et de la biomasse microbienne sur RStudio®. Les données de séquençage ont d'abord été analysées à l'aide de la pipeline PRONAME, puis j'ai réalisé des analyses statistiques sur QIIME2 pour étudier la diversité microbienne. Cela m'a permis d'identifier des genres bactériens émergeant ou disparaissant en présence de ces herbicides. L'interprétation des résultats et la rédaction de ce rapport ont été réalisés par mes soins.

7 Conclusions et perspectives

L'objectif de cette étude était d'examiner l'impact des herbicides FUEGO® et CARPATUS® sur les communautés microbiennes du sol, et de développer des indicateurs microbiens attestant la présence de ces herbicides dans le sol.

Dans un premier temps, cette étude a évalué les effets écotoxicologiques de ces herbicides sur l'activité, la respiration et la biomasse microbienne globale. Les résultats montrent que, dans les conditions expérimentales testées, ces herbicides n'ont pas d'impact négatif significatif sur l'activité et la respiration microbienne. Au contraire, l'ajout de ces herbicides, à faible dose, a pu servir de source de carbone ou d'énergie, augmentant ainsi l'activité microbienne. Cependant, les effets sur la biomasse fongique et bactérienne varient entre les deux herbicides. L'application de FUEGO®, toutes doses confondues, tend à diminuer la biomasse fongique sans affecter la biomasse bactérienne, tandis que l'application de CARPATUS®, toutes doses confondues, tend à augmenter à la fois la biomasse fongique et la biomasse bactérienne.

Dans un deuxième temps, et de manière innovante, cette étude a utilisé le séquençage nanopore pour analyser la diversité, la richesse et l'abondance bactériennes. À ce jour, c'est la première fois que cette technologie avancée est employée pour évaluer les effets d'herbicides sur les communautés microbiennes du sol. Les résultats ont montré que l'herbicide FUEGO® n'a pas d'impact significatif sur les communautés bactériennes, tandis que l'herbicide CARPATUS® a légèrement modifié la composition des communautés bactériennes.

Enfin, bien que l'identification de bioindicateurs microbiens spécifiques n'ait pas été possible, Cette étude a ouvert des pistes prometteuses pour le développement d'un outil de diagnostic innovant dans le cadre du projet MICROSENSE. Il pourrait s'agir d'un système inspiré du Biolog®, mais adapté pour détecter la présence des herbicides en identifiant un ensemble d'activités enzymatiques affectées par ces produits, ou d'une approche ciblant les bioindicateurs fongiques, connus pour leur sensibilité accrue aux variations environnementales

Dans la perspective de renforcer ces premiers résultats, il serait bénéfique de mener des études complémentaires. Par exemple, des dosages précis des herbicides avant et après leur application dans les microcosmes permettrait de mieux comprendre leur dynamique dans le sol. De plus, garantir des conditions expérimentales homogènes est essentiel pour minimiser les variations qui pourraient influencer les activités microbiennes observées. Par ailleurs, bien que l'expérimentation ait été réalisée sur un seul type de sol, il est possible que l'effet

écotoxicologique de ces herbicides soit plus prononcé sur d'autres communautés microbiennes, absentes ou minoritaires dans le type de sol utilisé pour cette étude, mais potentiellement majoritaires dans d'autres contextes environnementaux. Il serait donc intéressant de reproduire cette étude sur divers types de sols, notamment ceux ayant déjà été exposés à des pesticides, pour évaluer la variabilité des réponses microbiennes en fonction des caractéristiques spécifiques des sols.

8 Bibliographie

- Abraham W.-R. & Rohde M., 2014. The Family Hyphomonadaceae. *In*: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. eds. *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*. Springer, Berlin, Heidelberg, 283–299.
- Adam G. & Duncan H., 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry* **33**(7), 943–951, DOI:10.1016/S0038-0717(00)00244-3.
- Aires T., Cúcio C., Brakel J., Weinberger F., Wahl M., Teles A., Muyzer G. & Engelen A.H., 2024. Impact of persistently high sea surface temperatures on the rhizobiomes of *Zostera marina* in a Baltic Sea benthocosms. *Global Change Biology* **30**(5), e17337, DOI:10.1111/gcb.17337.
- Aislabie J. & Lloyd-Jones G., 1995. A review of bacterial-degradation of pesticides. *Soil Res.* **33**(6), 925–942, DOI:10.1071/sr9950925.
- Arshad M.A. & Martin S., 2002. Identifying critical limits for soil quality indicators in agro-ecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, Soil Health as an Indicator of Sustainable Management **88**(2), 153–160, DOI:10.1016/S0167-8809(01)00252-3.
- Artuso I., Turrini P., Pirolo M., Lugli G.A., Ventura M. & Visca P., 2021. Phylogenomic Reconstruction and Metabolic Potential of the Genus *Aminobacter*. *Microorganisms* **9**, 1332, DOI:10.3390/microorganisms9061332.
- Ashton I.A., Abulnaja K.O., Pallett K.E., Cole D.J. & Harwood J.L., 1994. The mechanism of inhibition of fatty acid synthase by the herbicide diflufenican. *Phytochemistry*, The International Journal of Plant Biochemistry **35**(3), 587–590, DOI:10.1016/S0031-9422(00)90566-1.
- Authority (EFSA) E.F.S., Brancato A., Brocca D., Bura L., Byers H., Chiusolo A., Court Marques D., Crivellente F., De Lentdecker C., De Maglie M., Egsmose M., Erdos Z., Fait G., Ferreira L., Goumenou M., Greco L., Istace F., Jarrah S., Kardassi D., Leuschner R., Lythgo C., Magrans J.O., Medina P., Miron I., Molnar T., Nougadere A., Padovani L., Parra Morte J.M., Pedersen R., Reich H., Sacchi A., Santos M., Serafimova R., Stanek A., Sturma J., Tarazona J., Terron A., Theobald A., Vagenende B., Verani A. & Villamar-Bouza L., 2017. Peer review of the pesticide risk assessment for the active substance metazachlor in light of confirmatory data submitted. *EFSA Journal* **15**(6), e04833, DOI:10.2903/j.efsa.2017.4833.

Baćmaga M., Borowik A., Kucharski J., Tomkiel M. & Wyszowska J., 2015. Microbial and enzymatic activity of soil contaminated with a mixture of diflufenican + mesosulfuron-methyl + iodosulfuron-methyl-sodium. *Environ Sci Pollut Res Int* **22**(1), 643–656, DOI:10.1007/s11356-014-3395-5.

Baćmaga M., Kucharski J., Wyszowska J., Borowik A. & Tomkiel M., 2014. Responses of microorganisms and enzymes to soil contamination with metazachlor. *Environ Earth Sci* **72**(7), 2251–2262, DOI:10.1007/s12665-014-3134-8.

Beulke S. & Malkomes H.-P., 2001. Effects of the herbicides metazachlor and dinoterb on the soil microflora and the degradation and sorption of metazachlor under different environmental conditions. *Biol Fertil Soils* **33**(6), 467–471, DOI:10.1007/s003740100354.

Branton D., Deamer D.W., Marziali A., Bayley H., Benner S.A., Butler T., Di Ventra M., Garaj S., Hibbs A., Huang X., Jovanovich S.B., Krstic P.S., Lindsay S., Ling X.S., Mastrangelo C.H., Meller A., Oliver J.S., Pershin Y.V., Ramsey J.M., Riehn R., Soni G.V., Tabard-Cossa V., Wanunu M., Wiggin M. & Schloss J.A., 2008. The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nat Biotechnol* **26**(10), 1146–1153, DOI:10.1038/nbt.1495.

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. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(6), 3593–3599, DOI:10.1128/AEM.69.6.3593-3599.2003.

Carpio M.J., García-Delgado C., Marín-Benito J.M., Sánchez-Martín M.J. & Rodríguez-Cruz M.S., 2020. Soil Microbial Community Changes in a Field Treatment with Chlorotoluron, Flufenacet and Diflufenican and Two Organic Amendments. *Agronomy* **10**(8), 1166, DOI:10.3390/agronomy10081166.

Chaplain V., Mamy L., Vieublé Gonod L., Mougin C., Benoit P., Barriuso E. & Nélieu S., 2011. Fate of Pesticides in Soils: Toward an Integrated Approach of Influential Factors. 535–560.

Chaudhari Y.S., Kumar P., Soni S., Gacem A., Kumar V., Singh S., Yadav V.K., Dawane V., Piplode S., Jeon B.-H., Ibrahim H.A., Hakami R.A., Alotaibi M.T., Abdellattif M.H., Cabral-Pinto M.M.S., Yadav P. & Yadav K.K., 2023. An inclusive outlook on the fate and persistence of pesticides in the environment and integrated eco-technologies for their degradation. *Toxicology and Applied Pharmacology* **466**, 116449, DOI:10.1016/j.taap.2023.116449.

Christel A., Maron P. & Ranjard L., 2022. Méta-analyse sur l'impact des modes de production agricole sur la qualité écologique du sol. *Étude et Gestion des Sols* **29 Numéro spécial "20 ans du RMQS"**, 117.

CRA-W. | Centre wallon de Recherches C.-W. | C. wallon de R., May-15-2024. MICROSENSE. *CRA-W | Centre wallon de Recherches agronomiques*. <https://www.cra.wallonie.be/fr/microsense>, (15/05/2024).

Crouzet O., Batisson I., Besse-Hoggan P., Bonnemoy F., Bardot C., Poly F., Bohatier J. & Mallet C., 2010. Response of soil microbial communities to the herbicide mesotrione: A dose-effect microcosm approach. *Soil Biology and Biochemistry* **42**, 193–202, DOI:10.1016/j.soilbio.2009.10.016.

Cycoń M., Wójcik M., Borymski S. & Piotrowska-Seget Z., 2013. Short-term effects of the herbicide napropamide on the activity and structure of the soil microbial community assessed by the multi-approach analysis. *Applied Soil Ecology* **66**, 8–18, DOI:10.1016/j.apsoil.2013.01.014.

Darine T., Alaeddine C., Fethi B. & Ridha M., 2015. Fluazifop-*P*-butyl (herbicide) affects richness and structure of soil bacterial communities. *Soil Biology and Biochemistry* **81**, 89–97, DOI:10.1016/j.soilbio.2014.10.030.

Dayan F.E., 2019. Current Status and Future Prospects in Herbicide Discovery. *Plants* **8**(9), 341, DOI:10.3390/plants8090341.

Domingues I., Agra A.R., Monaghan K., Soares A.M.V.M. & Nogueira A.J.A., 2010. Cholinesterase and glutathione-S-transferase activities in freshwater invertebrates as biomarkers to assess pesticide contamination. *Environ Toxicol Chem* **29**(1), 5–18, DOI:10.1002/etc.23.

Doran J.W. & Parkin T.B., 1994. Defining and Assessing Soil Quality. In: *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. John Wiley & Sons, Ltd, 1–21.

Dubois B., Debode F., Hautier L., Hulin J., Martin G.S., Delvaux A., Janssen E. & Mingeot D., 2022. A detailed workflow to develop QIIME2-formatted reference databases for taxonomic analysis of DNA metabarcoding data. *BMC Genomic Data* **23**(1), 53, DOI:10.1186/s12863-022-01067-5.

Dubois B., Delitte M., Lengrand S., Bragard C., Legrève A. & Debode F. (2024). PRONAME: a user-friendly pipeline to process long-read Nanopore metabarcoding data by generating high-quality consensus sequences. *BMC Bioinformatics*, submitted.

Dücker R., Zöllner P., Lümmer P., Ries S., Collavo A. & Beffa R., 2019. Glutathione transferase plays a major role in flufenacet resistance of ryegrass (*Lolium* spp.) field populations. *Pest Management Science* **75**(11), 3084–3092, DOI:10.1002/ps.5425.

Edwards C.A., 1975. FACTORS THAT AFFECT THE PERSISTENCE OF PESTICIDES IN PLANTS AND SOILS. In: Varo, P. ed. *Pesticide Chemistry*–3. Butterworth-Heinemann, 39–56.

EFSA, 2010. Scientific Opinion on title of the opinion. *s ERA*.

FAO, 2017. *The State of Food and Agriculture 2017: Leveraging food systems for inclusive rural transformation*, La situation mondiale de l'alimentation et l'agriculture (SOFA), FAO, Rome, Italy, 181.

FAO, 2023. *Résumé de La Situation mondiale de l'alimentation et de l'agriculture 2023: Pour une transformation des systèmes agroaliment: connaître le coût véritable des aliments*, FAO, Rome, Italy, 28.

Flow Cell (R10.4.1), August-2-2024. . <https://store.nanoporetech.com/eu/flow-cell-r10-4-1.html>, (02/08/2024).

Garcia C., Hernandez T. & Costa F., 1997. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* DOI:10.1080/00103629709369777.

Gil-Sotres F., Trasar-Cepeda C., Leirós M.C. & Seoane S., 2005. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology and Biochemistry* **37**(5), 877–887, DOI:10.1016/j.soilbio.2004.10.003.

Gitsopoulos T., Georgoulas I., Vazanelli E. & Botsoglou D., 2024. Selectivity of the Premixtures Flufenacet, Diflufenican and Flufenacet, Diflufenican, Metribuzin on Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) and Barley (*Hordeum vulgare* L.) and Efficacy on ALS/ACCase-Resistant Populations of *Lolium rigidum* Gaudin. *Agronomy* **14**(5), 949, DOI:10.3390/agronomy14050949.

Glüge J., Scheringer M., T. Cousins I., C. DeWitt J., Goldenman G., Herzke D., Lohmann R., A. Ng C., Trier X. & Wang Z., 2020. An overview of the uses of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS). *Environmental Science: Processes & Impacts* **22**(12), 2345–2373, DOI:10.1039/D0EM00291G.

Gouel C. & Guimbard H., 2017. La demande alimentaire mondiale en 2050.

Griffiths B.S. & Philippot L., 2013. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbiology Reviews* **37**(2), 112–129, DOI:10.1111/j.1574-6976.2012.00343.x.

Gupta S. & Gajbhiye V.T., 2002. Effect of concentration, moisture and soil type on the dissipation of flufenacet from soil. *Chemosphere* **47**(9), 901–906, DOI:10.1016/S0045-6535(02)00017-6.

Heuer H., Krsek M., Baker P., Smalla K. & Wellington E.M., 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol* **63**(8), 3233–3241, DOI:10.1128/aem.63.8.3233-3241.1997.

Hodson J. & Williams N.A., 1988. The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by high performance liquid chromatography. *Chemosphere* **17**(1), 67–77, DOI:10.1016/0045-6535(88)90045-8.

Hussain S., Siddique T., Saleem M., Arshad M. & Khalid A., 2009. Chapter 5 Impact of Pesticides on Soil Microbial Diversity, Enzymes, and Biochemical Reactions. *In: Advances in Agronomy*. Academic Press, 159–200.

Iftikhar S., Turan V., Tauqeer H.M., Rasool B., Zubair M., Mahmood-ur-Rahman, Khan M.A., Akhtar S., Khan S.A., Basharat Z., Zulfiqar I., Iqbal J., Iqbal M. & Ramzani P.M.A., 2021. Chapter 5 - Phytomanagement of As-contaminated matrix: Physiological and molecular basis. *In: Hasanuzzaman, M., Prasad, M.N.V. eds. Handbook of Bioremediation*. Academic Press, 61–79.

Johnsen K., Jacobsen C.S., Torsvik V. & Sørensen J., 2001. Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils – a review. *Biol Fertil Soils* **33**(6), 443–453, DOI:10.1007/s003740100351.

Karier P., Kraus G. & Kolber I., 2017. Metazachlor traces in the main drinking water reservoir in Luxembourg: a scientific and political discussion. *Environmental Sciences Europe* **29**(1), 25, DOI:10.1186/s12302-017-0123-z.

Karlen D.L., Mausbach M.J. & Doran J.W., 1997. Soil Quality: A Concept, Definition, and Framework for Evaluation (A Guest Editorial) - Karlen - 1997 - Soil Science Society of America Journal - Wiley Online Library. [https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2136/sssaj1997.03615995006100010001x?casa_token=zMJ3aIO_RlQAAAAA%3Ab6nSmxy6g-H_g2oU63L0XAcWN1ELyRdG0c9XDLUAWXtVFzNBtJJub_NNfaU76Zpu7o6ys70Py_GntAn7,\(16/05/2024\).](https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2136/sssaj1997.03615995006100010001x?casa_token=zMJ3aIO_RlQAAAAA%3Ab6nSmxy6g-H_g2oU63L0XAcWN1ELyRdG0c9XDLUAWXtVFzNBtJJub_NNfaU76Zpu7o6ys70Py_GntAn7,(16/05/2024).)

Kaufman D.D., 1974. Degradation of Pesticides by Soil Microorganisms. *In: Pesticides in Soil and Water*. John Wiley & Sons, Ltd, 133–202.

Kirchman D.L., 2002. The ecology of Cytophaga–Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology* **39**(2), 91–100, DOI:10.1111/j.1574-6941.2002.tb00910.x.

Koçak B., 2023. Influence of Fungicides on Soil Protease Activity: A Mini-Review. 5–17.

Köhler H.-R. & Triebskorn R., 2013. Wildlife Ecotoxicology of Pesticides: Can We Track Effects to the Population Level and Beyond? *Science* **341**(6147), 759–765, DOI:10.1126/science.1237591.

Labbé N., Parent S. & Villemur R., 2004. Nitratireductor aquibiodomus gen. nov., sp. nov., a novel α -proteobacterium from the marine denitrification system of the Montreal Biodome (Canada). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(1), 269–273, DOI:10.1099/ijs.0.02793-0.

Li S.-H., Kang I. & Cho J.-C., 2023. Metabolic Versatility of the Family Halieaceae Revealed by the Genomics of Novel Cultured Isolates. *Microbiology Spectrum* **11**(2), e03879-22, DOI:10.1128/spectrum.03879-22.

Lobo S.A.L., Warren M.J. & Saraiva L.M., 2012. Chapter Seven - Sulfate-Reducing Bacteria Reveal a New Branch of Tetrapyrrole Metabolism. *In: Poole, R.K. ed. Advances in Microbial Physiology*, Advances in Bacterial Respiratory Physiology. Academic Press, 267–295.

- Lu H., Giordano F. & Ning Z., 2016. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* **14**(5), 265–279, DOI:10.1016/j.gpb.2016.05.004.
- Martin-Laurent F., Pesce S., Crouzet O., Cheviron N., Mamy L., Mougin C. & Benoit P., 2016. Développement d'indicateurs microbiens pour l'évaluation de l'impact des pesticides sur des fonctions écosystémiques terrestres et aquatiques (acronyme : IMPEC).
- McIlroy S.J. & Nielsen P.H., 2014. The family saprospiraceae. *In*: Rosenberg, E., Delong, E., Lory, S., Stackbrandt, E., Thompson, F. eds. *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea. [4th Ed.]*. Springer, Berlin, Heidelberg, 863–889.
- Megharaj M., Boul H.L. & Thiele J.H., 1999. Effects of DDT and its metabolites on soil algae and enzymatic activity. *Biol Fertil Soils* **29**(2), 130–134, DOI:10.1007/s003740050534.
- Mesnager R., Ferguson S., Brandsma I., Moelijker N., Zhang G., Mazzacova F., Caldwell A., Halket J. & Antoniou M.N., 2022. The surfactant co-formulant POEA in the glyphosate-based herbicide RangerPro but not glyphosate alone causes necrosis in Caco-2 and HepG2 human cell lines and ER stress in the ToxTracker assay. *Food and Chemical Toxicology* **168**, 113380, DOI:10.1016/j.fct.2022.113380.
- Moscatelli M.C., Lagomarsino A., Garzillo A.M.V., Pignataro A. & Grego S., 2012. β -Glucosidase kinetic parameters as indicators of soil quality under conventional and organic cropping systems applying two analytical approaches. *Ecological Indicators* **13**(1), 322–327, DOI:10.1016/j.ecolind.2011.06.031.
- Nahar K., Niven R.K., Pearson S., Badek K., Riesen H. & Rahman A.F.M., 2013. Glyphosate in waters and soils from genetically modified canola cultivation in Parkes, NSW, Australia. *In: Proceedings of the 2013 Conference of the Australian Society for Engineering in Agriculture (SEAg 2013)*. Presented at the SEAg 2013: Innovative Agricultural Technologies for a Sustainable Future University of Southern Queensland, Barton, ACT, Australia.
- NucleoSpin Soil, Mini kit for DNA from soil, March-18-2024. . *MACHEREY-NAGEL*. <https://www.mn-net.com/nucleospin-soil-mini-kit-for-dna-from-soil-740780.50>, (18/03/2024).
- Olakanye A.O. & Ralebitso-Senior T.K., 2018. Chapter 7 - Assessing Subsurface Decomposition and Potential Impacts on Forensic Investigations. *In*: Ralebitso-Senior, T.K. ed. *Forensic Ecogenomics*. Academic Press, 145–176.

Pant A. (Ed.), 2024. Transcriptomics. *In: Dictionary of Toxicology*. Springer Nature, Singapore, 1007–1008.

Pathak P., Sahrawat K., Rego T. & Wani S., 2005. Measurable Biophysical Indicators for Impact Assessment: Changes in Soil Quality. 53–73.

Postollec F., Falentin H., Pavan S., Combrisson J. & Sohier D., 2011. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology* **28**(5), 848–861, DOI:10.1016/j.fm.2011.02.008.

Quénard L., Samouëlian A., Laroche B. & Cornu S., 2011. Lessivage as a major process of soil formation: A revisitation of existing data. *Geoderma* **167–168**, 135–147, DOI:10.1016/j.geoderma.2011.07.031.

Rangani G., Noguera M., Salas-Perez R., Benedetti L. & Roma-Burgos N., 2021. Mechanism of Resistance to S-metolachlor in Palmer amaranth. *Front Plant Sci* **12**, 652581, DOI:10.3389/fpls.2021.652581.

Recherche de produits phytopharmaceutiques | Phytoweb, May-15-2024a. .
<https://apps.health.belgium.be/fytoweb/pages/public/detail.xhtml?dswid=-1296&product=38755658#mainForm:historyPanel>, (15/05/2024).

Recherche de produits phytopharmaceutiques | Phytoweb, May-15-2024b. .
<https://apps.health.belgium.be/fytoweb/pages/public/detail.xhtml?dswid=-5847&product=38942461>, (15/05/2024).

Reddy K.N. & Locke M.A., 1994. Prediction of Soil Sorption (Koc) of Herbicides Using Semiempirical Molecular Properties. *Weed Science* **42**(3), 453–461, DOI:10.1017/S0043174500076761.

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

Ryan M.P., Sevjahova L., Gorman R. & White S., 2022. The Emergence of the Genus *Comamonas* as Important Opportunistic Pathogens. *Pathogens* **11**(9), 1032, DOI:10.3390/pathogens11091032.

Satola B., Wübbeler J.H. & Steinbüchel A., 2013. Metabolic characteristics of the species *Variovorax paradoxus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**(2), 541–560, DOI:10.1007/s00253-012-4585-z.

Schlöter M., Nannipieri P., Sørensen S.J. & van Elsas J.D., 2018. Microbial indicators for soil quality. *Biol Fertil Soils* **54**(1), 1–10, DOI:10.1007/s00374-017-1248-3.

Sharma S., Ramesh A., Sharma M., Joshi O., Govaerts B., Steenwerth K. & Karlen D., 2010. Microbial Community Structure and Diversity as Indicators for Evaluating Soil Quality. *In: Biodiversity, Biofuels, Agroforestry and Conservation Agriculture*. 317–358.

Stefanowicz A., 2006. The Biolog Plates Technique as a Tool in Ecological Studies of Microbial Communities. *Polish Journal of Environmental Studies* **15**, 669–676.

Steinweg, M., & McMahon, S. (2012). Microplate Enzyme Assay Using Fluorescence.

Szabó P., Jordan G., Kocsis T., Posta K., Kardos L., Šajn R. & Alijagić J., 2022. Biomonitoring and assessment of toxic element contamination in floodplain sediments and soils using fluorescein diacetate (FDA) enzymatic activity measurements: evaluation of possibilities and limitations through the case study of the Drava River floodplain. *Environ Monit Assess* **194**(9), 632, DOI:10.1007/s10661-022-10301-7.

Szpyrka E., Słowik-Borowiec M., Książek P., Zwolak A. & Podbielska M., 2020. The difference in dissipation of clomazone and metazachlor in soil under field and laboratory conditions and their uptake by plants. *Sci Rep* **10**(1), 3747, DOI:10.1038/s41598-020-60720-0.

Tejada M., 2009. Evolution of soil biological properties after addition of glyphosate, diflufenican and glyphosate+diflufenican herbicides. *Chemosphere* **76**(3), 365–373, DOI:10.1016/j.chemosphere.2009.03.040.

Terol H., Thiour-Mauprivez C., Devers M., Martin-Laurent F., Suzuki M., Calvayrac C. & Barthelmebs L., 2024. “Structural responses of non-targeted bacterial and *hppd* communities to the herbicide tembotrione in soil.” *Science of The Total Environment* **908**, 168198, DOI:10.1016/j.scitotenv.2023.168198.

Teske A. & Salman V., 2014. The Family Beggiatoaceae. *In: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. eds. The Prokaryotes: Gammaproteobacteria*. Springer, Berlin, Heidelberg, 93–134.

The James Hutton Institute, 2019. Science behind MicroRespTM. <https://www.microresp.com/science>, (24/06/2024).

Thibault C. & Lecompte F., 2018. Gestion de la fertilité des sols en cultures légumières et maraîchères. (report).

Thiour-Mauprivez C., Dayan F.E., Terol H., Devers M., Calvayrac C., Martin-Laurent F. & Barthelmebs L., 2023. Assessing the effects of β -triketone herbicides on HPPD from environmental bacteria using a combination of in silico and microbiological approaches. *Environ Sci Pollut Res* **30**(4), 9932–9944, DOI:10.1007/s11356-022-22801-7.

Thiour-Mauprivez C., Martin-Laurent F., Calvayrac C. & Barthelmebs L., 2019. Effects of herbicide on non-target microorganisms: Towards a new class of biomarkers? *Science of The Total Environment* **684**, 314–325, DOI:10.1016/j.scitotenv.2019.05.230.

Tiryaki O. & Temur C., 2010. The Fate of Pesticide in the Environment.

Vobis G., Schäfer J. & Kämpfer P., 2015. Actinoplanes. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, 1–41.

Wang G., Jin Z., Wang X., George T.S., Feng G. & Zhang L., 2022. Simulated root exudates stimulate the abundance of Saccharimonadales to improve the alkaline phosphatase activity in maize rhizosphere. *Applied Soil Ecology* **170**, 104274, DOI:10.1016/j.apsoil.2021.104274.

Wang K., Jia R., Li L., Jiang R. & Qu D., 2020. Community structure of Anaeromyxobacter in Fe(III) reducing enriched cultures of paddy soils. *J Soils Sediments* **20**(3), 1621–1631, DOI:10.1007/s11368-019-02529-7.

WANG M.-C., GONG M., ZANG H.-B., HUA X.-M., YAO J., PANG Y.-J. & YANG Y.-H., 2006. Effect of Methamidophos and Urea Application on Microbial Communities in Soils as Determined by Microbial Biomass and Community Level Physiological Profiles. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* **41**(4), 399–413, DOI:10.1080/03601230600616155.

Warnasuriya S.D. & Udayanga D., 2023. Fungi as environmental bioindicators - ScienceDirect. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969723032047?casa_token=DZD6-qm5OnIAAAAAA:-m5jDYwo3iSHBo1Gt3GJKrs8bKgpwyduVxFinbW38tgJuWKZLAJh4tFw0GBL196EmuKZU1Yjx9M, (11/08/2024).

Willkommen S., Pfannerstill M., Ulrich U., Guse B. & Fohrer N., 2019. How weather conditions and physico-chemical properties control the leaching of flufenacet, diflufenican, and pendimethalin in a tile-drained landscape. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **278**, 107–116, DOI:10.1016/j.agee.2019.03.017.

Willms I.M., Rudolph A.Y., Göschel I., Bolz S.H., Schneider D., Penone C., Poehlein A., Schöning I. & Nacke H., 2020. Globally Abundant “Candidatus Udaeobacter” Benefits from Release of Antibiotics in Soil and Potentially Performs Trace Gas Scavenging. *mSphere* **5**(4), e00186-20, DOI:10.1128/mSphere.00186-20.

Yang Gao, Zhou Pei, & Mao Liang, 2009. Assessment of effects of heavy metals combined pollution on soil enzyme activities and microbial community structure: modified ecological dose–response model and PCR-RAPD. *CoLab*. <https://colab.ws/articles/10.1007%2Fs12665-009-0200-8>, (05/08/2024).

Zabaloy M.C., Garland J.L. & Gomez M.A., 2010. Assessment of the impact of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on indigenous herbicide-degrading bacteria and microbial community function in an agricultural soil. *Applied Soil Ecology* **46**(2), 240–246, DOI:10.1016/j.apsoil.2010.08.006.

Zhou N., Keffer J.L., Polson S.W. & Chan C.S., 2022. Unraveling Fe(II)-Oxidizing Mechanisms in a Facultative Fe(II) Oxidizer, Sideroxydans lithotrophicus Strain ES-1, via Culturing, Transcriptomics, and Reverse Transcription-Quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **88**(2), e01595-21, DOI:10.1128/AEM.01595-21.

9 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 $\mu\text{g/80g}$
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 :

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

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. Eviter 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 : $\%CoV = (\text{écart-type}/\text{moyenne}) \times 100$
- Sauvegarder les résultats du temps 0.
- Remplacer 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.
- Remplacer 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.

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.



250–500 mg
sample
+700 µL SL1
or SL2

2 Adjust lysis conditions

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

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.



+150 µL SX

3 Sample lysis

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

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**.



Vortex
RT, 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 (ThermoFisher 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

- ☐ 10 ng high molecular weight genomic DNA
- ☐ 16S Barcoding Kit 1-24 (SQK-16S024)
- ☐ Flow Cell Priming Kit (EXP-FLP002)

Consumables

- ☐ 1.5 ml Eppendorf DNA LoBind tubes
- ☐ 0.2 ml thin-walled PCR tubes
- ☐ Nuclease-free water (e.g. ThermoFisher, cat # AM9937)
- ☐ Agencourt AMPure XP beads
- ☐ LongAmp Hot Start Taq 2X Master Mix (NEB, M0533S)
- ☐ Freshly prepared 70% ethanol in nuclease-free water
- ☐ 10 mM Tris-HCl pH 8.0 with 50 mM NaCl

Equipment

- ☐ Microfuge
- ☐ Timer
- ☐ Thermal cycler
- ☐ Pipettes and pipette tips P2, P10, P20, P100, P200, P1000

INSTRUCTIONS

NOTES/OBSERVATIONS

INSTRUCTIONS

Library preparation

- ☐ 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

- ☐ 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.

- ☐ Thaw the desired barcodes, make sure the liquid is at the bottom of the tubes, and place on ice.

- ☐ 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.

- ☐ Transfer 10 ng genomic DNA into a DNA LoBind tube
- ☐ Adjust the volume to 10 µl with Nuclease-free water
- ☐ Mix thoroughly by flicking the tube, to avoid unwanted shearing
- ☐ 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.

- ☐ 5 µl Nuclease-free water
- ☐ 10 µl Input DNA (10 ng)
- ☐ 25 µl LongAmp Hot Start Taq 2X Master Mix

- ☐ Mix gently by flicking the tube, and spin down.

- ☐ 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 µl 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 µl 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 µl 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 µl 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 µl 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 µl 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 µl of eluted sample using a Qubit fluorometer.

☐ Pool all barcoded libraries in the desired ratios to a total of 50-100 fmoles in 10 µl 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 µl of RAP to the barcoded DNA.

☐ Mix gently by flicking the tube, and spin down.

INSTRUCTIONS
<input type="checkbox"/> 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
<input type="checkbox"/> 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.
<input type="checkbox"/> Thaw the Sequencing Buffer (SQB), Loading Beads (LB), Flush Tether (FLT) and one tube of Flush Buffer (FB) at RT.
<input type="checkbox"/> Mix the Sequencing Buffer (SQB), Flush Tether (FLT) and Flush Buffer (FB) tubes by vortexing and spin down at RT.
<input type="checkbox"/> Open the MinION Mk1B lid and slide the flow cell under the clip.
<input type="checkbox"/> Slide the priming port cover clockwise to open the priming port.
IMPORTANT
<input type="checkbox"/> Take care when drawing back buffer from the flow cell. Do not remove more than 20-30 μ l, 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 μ l): <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Set a P1000 pipette to 200 μl <input type="checkbox"/> Insert the tip into the priming port <input type="checkbox"/> Turn the wheel until the dial shows 220-230 μl, or until you can see a small volume of buffer entering the pipette tip
<input type="checkbox"/> To prepare the flow cell priming mix, add 30 μ l of thawed and mixed Flush Tether (FLT) directly to the tube of thawed and mixed Flush Buffer (FB), and mix by vortexing at RT.
<input type="checkbox"/> Load 800 μ l 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.
<input type="checkbox"/> Thoroughly mix the contents of the Loading Beads (LB) tubes by vortexing.
IMPORTANT
<input type="checkbox"/> 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: <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 34 μl Sequencing Buffer (SQB) <input type="checkbox"/> 25.5 μl Loading Beads (LB), mixed immediately before use <input type="checkbox"/> 4.5 μl Nuclease-free water <input type="checkbox"/> 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.

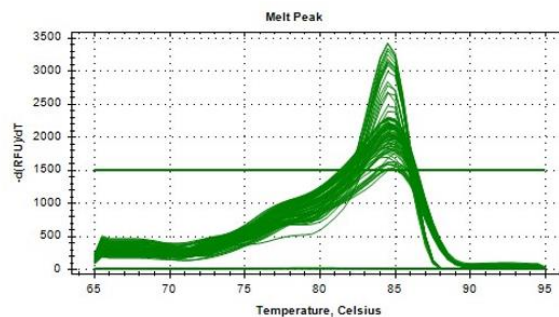
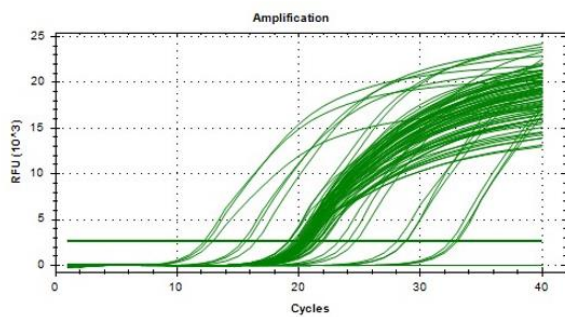
Ending the experiment

- ☐ 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.

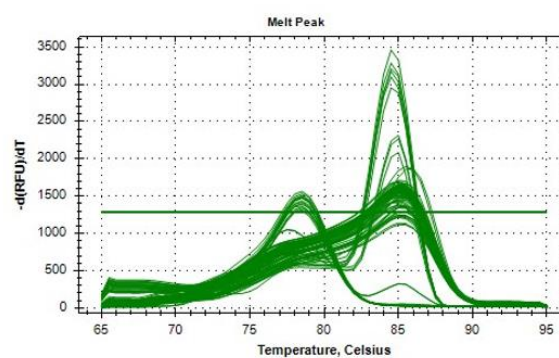
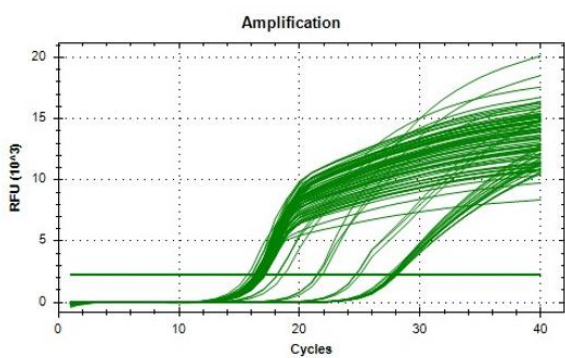
IMPORTANT

- ☐ 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.

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>Nitrateductor</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

