



ECOLE NATIONALE DU GENIE RURAL, DES EAUX ET DES FORÊTS

N° attribué par la bibliothèque
/ / / / / / / / / / / / / / / /

THESE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'ENGREF
Spécialité : Sciences Forestières

présentée et soutenue publiquement par
Heidy SCHIMANN

le 1^{er} juillet 2005


à l'Ecole Nationale du Génie Rural, des Eaux et Forêts
Centre de : Kourou

TITRE :

**Impacts de perturbations liées à l'orpaillage sur
l'évolution des communautés et fonctionnalités
microbiennes d'un sol**

devant le jury suivant :

Mme. Anne-Marie Domenach	Directrice de thèse
M. Luc Abbadie	Rapporteur
M. René Bally	Rapporteur
M. João Ferraz	Examineur
M. Robert Lensi	Président
M. Jean-Christophe Roggy	Examineur



**"Voici
Terre de colline bleue
Feuilles immenses des ravinala
Blancs éventails
Qui dessinent à l'horizon les motifs des voyages"**

L'Arbre Anthropophage
Raharimanana, 2004

"L'humanité s'installe dans la monoculture ; elle s'apprête à produire la civilisation en masse, comme la betterave."

Claude Lévi-Strauss, *Tristes Tropiques*, 1955

A Maryème,
pour son courage, sa force et sa joie de vivre,

A Marius,
pour son indéfectible soutien et son infinie patience,

A mes parents,
pour m'avoir appris la tolérance, la curiosité et l'esprit critique,

A Madagascar,
pour Fianarantsoa, Antsiranana, Ramena, la Montagne d'Ambre, la place Kabary,

Que les esprits de la Grande Île restent posés sur mon épaule et continuent de m'accompagner.....

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	3
CHAPITRE BIBLIOGRAPHIQUE.....	7
1. La Guyane et l'exploitation aurifère:.....	7
2. Services aux sociétés:.....	10
2.1. Un service environnemental : le maintien des cycles biogéochimiques.....	12
2.1.1. Le cycle du carbone:.....	12
2.1.2. Le cycle de l'azote:.....	14
2.1.3. La dénitrification : actrice et bioindicatrice du fonctionnement du sol:.....	15
3. Ingénierie écologique:.....	18
4. Bioindicateurs :.....	20
4.1. Qualité du sol et restauration :.....	20
4.2. Adéquation microorganismes-bioindication:	22
CHAPITRE 2 :IMPACT DE LA REVEGETALISATION SUR LA RECUPERATION DES FONCTIONS BIOLOGIQUES DU SOL : CAS DE LA REHABILITATION D'UN SITE MINIER	24
1. Abstract:.....	25
2. Introduction:	25
3. Methods	27
3.1. Experimental site and sampling strategy:.....	27
3.2. Soil characteristics:	28
3.2.1. Physical-chemical characteristics	28
3.2.2. NIRS (Near Infrared Reflectance Spectroscopy) measurements:	28
3.3. Microbial activities:	29
3.3.1. Potential denitrifying activity of soil (Tiedje, 1984a; Lensi, 1985):.....	29
3.3.2. Potential respiratory activity of soil:.....	29
3.3.3. Activity of denitrification and respiration in “actual” conditions:	29
3.3.4. Ratio:	29
3.4. Statistical analysis:.....	29
4. Results:	30
4.1. Microbial activities in the different treatments (table 2):.....	30

4.1.1. Respiratory activity:.....	30
4.1.2. Denitrifying activity:	30
4.1.3. Microbial activities ratios (Figure 1):	30
4.1.3.1. Ratios between "actual" and potential activity:.....	30
4.1.3.2. Ratios between potential denitrification and potential respiration:	30
4.2. Analysis of soil samples by NIRS (figure 2):.....	31
5. Discussion	31
6. Conclusions	33
7. Literature Cited	35
CHAPITRE 3 : IMPACTS DE PERTURBATIONS SUR LE FONCTIONNEMENT DU SOL.....	39
1. Evaluation of quantitative and qualitative recovery of bacterial communities from different soil types by density gradient centrifugation	40
1.1. Abstract	40
1.2. Introduction.....	41
1.3. Materials and methods	42
1.3.1. Soils	42
1.3.2. Extraction of bacteria from the soil matrix	42
1.3.3. Bacterial counts	43
1.3.4. DNA extraction.....	43
1.3.5. A-RISA fingerprinting of bacterial communities	44
1.3.6. Statistical analysis.....	44
1.4. Results and discussion.....	45
1.4.1. Influence of soil type on the quantitative recovery of bacterial cells.....	45
1.4.2. Influence of soil characteristics on the quantitative recovery of soil DNA	46
1.4.3. Influence of soil characteristics on the qualitative recovery of soil bacterial community	46
1.5. References	49
2. Impacts du mercure sur le fonctionnement microbien du sol et sa capacité à résister à une seconde perturbation :	52
2.1. Introduction:.....	52
2.2. Matériel et méthodes:.....	53
2.2.1. Caractéristiques du sol utilisé, préparation des microcosmes et plan expérimental.....	53
2.2.2. Application des perturbations	54
2.2.3. Dénombrement des microorganismes du sol par Acridine Orange (A.O.):	55
2.2.4. Mesure de la respiration potentielle.....	55
2.2.5. Mesure de la dénitrification potentielle	56
2.2.6. Extraction d'ADN des sols et ARISA:	56
2.2.7. Teneur en mercure des sols:.....	57

2.2.8. Analyses statistiques:.....	58
2.3. Résultats:.....	58
2.3.1. Evolution de la densité des microorganismes (AODC):.....	58
2.3.2. Effet de la perturbation mercure sur la respiration et la dénitrification:.....	59
2.3.3. Effets du mercure sur la réponse de la respiration et de la dénitrification à la chaleur :.....	59
2.3.4. Evolution de la structure de la communauté microbienne du sol (ARISA):.....	59
2.4. Discussion:.....	60
2.4.1. Evolution de la densité des microorganismes:.....	60
2.4.2. Effet du mercure:.....	61
2.4.3. Effet du mercure sur la vulnérabilité des sols :.....	62
2.5. Conclusion :.....	63
2.6. Bibliographie:.....	64
CHAPITRE 4 :CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	79
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	85

Introduction Générale

L'impact des activités humaines et les perturbations qu'elles occasionnent sur les écosystèmes s'intègre dans des problématiques très actuelles. Etant donné la forte progression démographique ainsi que la nécessité d'une utilisation toujours plus large et intense des terres afin de subvenir aux besoins nutritionnels à l'échelle de la planète (Smil, 1997 ; Sala *et al.*, 2000), il semble aujourd'hui essentiel de focaliser les travaux recherche sur ce type de problématiques. L'écologie, compte tenu de sa capacité à apporter des éléments de solution aux problèmes environnementaux et de l'étendue de ses outils conceptuels et techniques, est au cœur de ces interrogations contemporaines. Cette discipline est appelée à prendre une signification sociale nouvelle. En effet, la capacité des sociétés humaines à intervenir sur l'ensemble du vivant, de même que les questions et conditions éthiques, culturelles, sociales et politiques qui s'y rattachent, ont amené au développement d'un mouvement global pour la sauvegarde de notre environnement interpellant toujours davantage la communauté scientifique. La montée en puissance du discours international ainsi que la mobilisation des chercheurs a culminé en 1992 durant la Conférence pour la Terre de Rio puis en 2001 à Kyoto. Les problématiques de gestion de la nature et de la biodiversité qui ont alors été mises en exergue font appel à des démarches pluridisciplinaires centrées sur les interactions entre (1) pratiques humaines et savoirs locaux et (2) conservation de la biodiversité et gestion durable des ressources et des écosystèmes. Pourtant, au-delà de l'amélioration des connaissances permettant de répondre à ces problématiques, il est nécessaire de s'interroger sur les capacités des sociétés humaines à prendre en charge la question de la biodiversité. Il est également important de considérer les conditions de mise en place et les modalités d'organisations collectives s'y rattachant mais aussi leurs conséquences pour l'avenir des relations sociétés/environnement pour la gestion de la planète (Michon, 2003). Il est donc important qu'en premier lieu existe une réelle volonté politique pour répondre à ces défis environnementaux (Suzuki, 2005). C'est probablement à travers un effort de conviction des opinions publiques qu'il sera possible de parvenir à cette volonté. Il appartiendra ensuite aux scientifiques – évidemment dans un cadre pluridisciplinaire – de proposer des solutions. Au préalable, approfondir nos connaissances sur l'ampleur des dégradations déjà existantes et les mécanismes les occasionnant est un pré-requis. L'efficacité de l'acquisition de ces données dépend

de la pertinence des démarches adoptées. Par exemple, l'étude de systèmes déjà dégradés présente un double intérêt pour mieux comprendre les interactions entre les perturbations – notamment d'origine anthropiques - et le fonctionnement des écosystèmes. En effet, elle permet, bien sur, d'étudier l'impact d'une perturbation donnée sur un écosystème donné. Mais, elle offre aussi la possibilité de bénéficier de situations comparatives systèmes perturbés vs non perturbés permettant de rechercher les mécanismes de réaction des systèmes, leurs conférant, de ce fait, une portée générique. Par exemple, des questions d'écologie fonctionnelle très actuelles - telles que le rôle de la biodiversité dans le fonctionnement des écosystèmes - peuvent être très avantageusement abordées *via* cette approche comparative. Une condition supplémentaire pour approfondir notre compréhension des relations fonctionnement/fonction/diversité/stabilité est de diversifier les modèles d'étude. En effet, jusqu'à présent, la majorité des études sur ce sujet ont été menées sur des végétaux et à un degré moindre sur des animaux (Tilman *et al.*, 1996; Grime 1997). Les microorganismes du sol n'ont que très rarement servis d'objet d'étude pour étudier ces interactions (Mikola & Setälä, 1998 ; Griffiths *et al.*, 2000a ; Müller *et al.*, 2002a). Pourtant, deux caractéristiques, au moins, des microorganismes en font des modèles pertinents : (1) leur très grande diversité taxonomique et métabolique (Wardle & Giller, 1996) ; (2) leur rôle essentiel dans la régulation des cycles biogéochimiques et de la productivité végétale (O'Donnell *et al.*, 2001 ; Wardle, 2002 ; Nannipieri *et al.*, 2003).

Les microorganismes constituent donc l'objet d'étude majeur de cette thèse et la question générale de recherche –déclinée en un volet *in situ* et un volet *in vitro* - se formalise de la manière suivante :

Selon quelle logique doit-on utiliser la composante microbienne pour associer entre elles les composantes suivantes :

- ✓ **fonction et diversité des microorganismes**
- ✓ **fonctionnement et stabilité de l'écosystème (modèle : forêt tropicale humide)**
- ✓ **perturbation (modèle : exploitation aurifère)**

Nous avons traité cette question générale sous deux aspects :

(1) Peut-on expliciter les relations existant entre les modalités de revégétalisation et la reconstruction des fonctionnalités d'un sol perturbé ?

(2) Quel est l'impact d'une première perturbation sur (i) le fonctionnement microbien du sol et (ii) la capacité du sol à résister à une seconde perturbation ?

Pour y répondre, nous avons alternativement (et souvent simultanément) considéré les microorganismes selon un double point de vue : acteurs de biotransformations et bio-descripteurs de l'état fonctionnel du sol. Ils sont abordés *via* les communautés fonctionnelles hétérotrophes et

dénitrifiantes. La définition de groupes fonctionnels s'agissant de microorganismes diffère de celle couramment utilisée avec les végétaux ou les animaux. Chez les organismes supérieurs, un groupe fonctionnel se caractérise par un ensemble d'espèces développant des réponses à l'environnement ou des effets sur les processus majeurs écosystémiques similaires (Lavorel & Garnier E, 2001). Chez les microorganismes le concept de « groupe fonctionnel » est généralement compris comme étant un ensemble de microorganismes génétiquement aptes à réaliser une biotransformation donnée.

Si l'on utilise les microorganismes comme des bio-descripteurs de fonctionnement, il est évident que parmi les composantes qui les caractérisent - densité, diversité, fonction- c'est cette dernière qui est la plus pertinente. Compte-tenu de leur très grande diversité métabolique, il n'est pas réaliste de prendre en compte l'ensemble des fonctions qu'ils sont capables de réaliser. Il est donc nécessaire de sélectionner des fonctions modèles ou de référence selon trois types de critères : (1) l'importance écologique des flux générés, (2) la représentativité par rapport à l'ensemble de la communauté microbienne du sol et, (3) l'accessibilité technique à la mesure des activités choisies. Dans notre travail, les fonctions choisies, et qui répondaient à ces critères, sont la respiration et la dénitrification. Ce sont deux processus respiratoires, mais qui nécessitent des conditions environnementales très différentes (aérobie pour la respiration et anaérobie pour la dénitrification) pour s'exprimer (Tiedje, 1984b). Ce sont des processus évidemment majeurs dans le fonctionnement des écosystèmes et portés par des communautés abondantes et diversifiées, donc représentatives du système sol. Enfin, elles présentent l'avantage de se trouver dans des proportions très différentes dans le sol : la communauté dénitrifiante principalement bactérienne représente 1 à 5 % de la communauté hétérotrophe du sol (Cavigelli & Robertson, 2000).

Organisation de la thèse :

Le chapitre 2 présente une étude *in situ* dont l'objectif a été de comprendre- en utilisant comme modèles des situations comparatives offertes par un système de revégétalisation sur la Mine Boulanger (Guyane Française) – les caractéristiques de reconstruction des fonctionnalités d'un sol fortement dégradé par des activités d'orpaillage. Plus particulièrement, il s'agissait d'essayer de comprendre les relations existant entre le type de végétation et la reconstruction des fonctionnalités du sol après une perturbation telle que l'extraction aurifère.

Le chapitre 3 présente une étude à caractère plus théorique dans laquelle le modèle microbien a été utilisé pour examiner la relation perturbation / biodiversité / fonctionnement / stabilité du système sol. Il s'agissait de comprendre l'impact d'une perturbation par le mercure sur (1) le fonctionnement microbien du sol et (2) la capacité du sol à résister à une seconde

perturbation. Cette expérience est une tentative de réponse à de grandes questions d'écologie fonctionnelle en utilisant le modèle microbien. Ce type de question nécessite au préalable d'être capable d'évaluer correctement la biodiversité microbienne globale des sols considérés. Dans les sols, la biodiversité microbienne est en général analysée à l'aide de deux catégories de méthodes : l'extraction de l'ADN total du sol ou l'extraction des microorganismes du sol afin d'en récupérer l'ADN (Ranjard *et al.*, 2000). Nous avons donc effectué une étude méthodologique préalable concernant l'impact du type d'extraction sur la diversité génétique des ADN du sol dans l'objectif d'évaluer au mieux la biodiversité globale des microorganismes du sol.

Afin d'affiner l'insertion de ces études sur les microorganismes dans une problématique environnementale générale, nous avons choisi, dans la synthèse bibliographique (chapitre 1), de présenter trois concepts qui nous ont semblé pertinents dans le cadre de notre travail : services rendus aux sociétés humaines par les écosystèmes, descripteurs de l'état des systèmes, ingénierie écologique. La tâche nous a paru délicate dans la mesure où ces notions se situent à la frontière entre différentes disciplines appartenant aux sciences biophysiques et aux sciences humaines et sociales. Dans une deuxième partie, nous nous sommes interrogés sur (1) le positionnement et l'importance des microorganismes dans ce contexte général, et (2) les démarches d'écologie microbienne à adopter pour rendre l'« objet » microbien le plus performant possible en termes de description de la « gravité » de l'impact subi par le système face à des perturbations et en termes de prévision de l'évolution du système. Enfin, pour conclure, nous nous attacherons à essayer de revenir sur les principaux résultats de ce travail et de proposer des perspectives de recherche permettant de répondre non seulement aux questions restées en suspens mais aussi à celles qui sont apparues au fur et à mesure du développement de la réflexion.

Chapitre bibliographique

Les tendances actuelles des recherches portant sur l'environnement sont d'atténuer des frontières devenues trop fortement étanches : entre disciplines, entre milieux, entre échelles spatio-temporelles, entre niveaux de complexité des organismes, entre recherche fondamentale et finalisée. Cette interdisciplinarité et cette association de milieux dans des études communes ont généré une évolution de concepts existants ou une émergence de nouveaux concepts. Du fait que les études sur les microorganismes restent relativement périphériques par rapport à ces tendances, comme nous l'avons vu, il nous est apparu intéressant, dans un travail d'écologie microbienne, de revenir sur un certain nombre de ces concepts. Compte-tenu de nos objectifs expérimentaux, trois ont été retenus : services aux sociétés humaines, ingénierie écologie et bioindicateurs. Préalablement, seront présentés une synthèse du cadre géographique et du contexte dans lequel se situe cette thèse.

1. La Guyane et l'exploitation aurifère:

La végétation de la Guyane s'intègre dans la province floristique du plateau des Guyanes qui constitue une entité sur le plan biogéographique. Cette région se compose d'une grande diversité d'écosystèmes : mangroves, marais, savanes et forêts marécageuses dans les plaines côtières alluviales, forêts basses et broussailles sur les sables blancs, forêts hautes et variées sur les collines de l'intérieur ponctuées de formations particulières telles que celles trouvées sur les inselbergs. Cette diversité de formation se traduit par une grande richesse floristique : d'après les dernières estimations, 8 à 10 000 espèces végétales vasculaires poussent dans la région des Guyanes (Barret, 2001). Le massif forestier guyanais représente près de 80 000 km², c'est-à-dire à peine 1% du massif amazonien (Puig, 2001). Cependant, les formations forestières et particulièrement les forêts hautes dominent nettement le département guyanais. Ces forêts poussent sur des sols rouges, ferrallitiques, argilo-sableux ou sablo-argileux. C'est dans ce type de formation que l'on trouve la plus grande complexité et la diversité spécifique la plus élevée. Ainsi, sur les 5200 espèces de plantes vasculaires recensées en Guyane, plus de 1200 sont des arbres. Les familles les mieux représentées sont les Légumineuses (plus de 170 espèces), les

Sapotacées (plus de 80 espèces), les Lauracées (70 espèces), les Chrysobalanacées (60 espèces), entre autres. Bien qu'il soit difficile de distinguer des groupements végétaux bien définis par leur structure et leur composition floristique parmi les forêts sur sols drainés, trois grandes catégories peuvent être distinguées selon la nature du sous-sol :

- les forêts moyennes à hautes sur schistes, quartzites et conglomérats, situées dans la chaîne septentrionale un peu en retrait des plaines côtières. Leur aspect est très variable : hautes et denses sur sols argileux ou basses et clairsemées sur conglomérats ;
- les forêts hautes sur roches basiques que l'on trouve essentiellement sur les grands massifs du centre. Ce sont les forêts les plus hautes avec des arbres atteignant fréquemment 40 à 50 m ;
- les forêts hautes sur roches cristallines, les plus étendues, avec une physionomie variable suivant le site, la pente, les conditions de drainage (Barret, 2001)

La forêt tropicale guyanaise se distingue aussi par sa situation politique. En effet, c'est le seul massif forestier tropical sous l'égide de l'Union Européenne. De plus, la quasi-totalité du massif est la propriété de l'Etat français et donc géré par l'Office National des Forêts. Cette gestion se fait entre autres par la définition d'un domaine forestier permanent dans lequel une zonation a été effectuée afin de distinguer des usages différents de la forêt. On trouve ainsi (1) des zones protégées ayant pour objectifs la conservation de milieux et d'espèces remarquables, le maintien des terres ou ayant une vocation touristique ; (2) des zones de production de bois d'œuvre essentiellement ; (3) des zones de subsistance pour les populations qui dépendent entièrement de la forêt et de ses produits ; (4) des zones boisées, non identifiées comme à vocation forestière à long terme, et ayant le statut de réserves foncières. Un autre objectif de l'ONF est de veiller aux modalités d'occupation, de conditions d'exercices des activités et à la maîtrise des impacts. La "Brigade Nature" a ainsi été créée dans les années 1990 afin d'assurer le contrôle des activités d'orpillage étant donné leur développement et leur impact environnemental très fort (Bordères, 2003).

La principale ressource minérale exploitée est l'or contenu dans les alluvions et éluvions aurifères. Actuellement, les indices et zones d'exploitations de l'or s'inscrivent à l'intérieur de deux bandes de terrains fertiles qui traversent d'Est en Ouest l'ensemble de la Guyane : au nord entre Ouanary et Grand-Santi, et au sud entre Camopi et Maripasoula majoritairement sur la formation géologique "Paramaca volcano-sédimentaire" (figure 1). Historiquement, la découverte de l'or date de 1857 et fut à l'origine d'une ruée qui culmina au début du XXème siècle et amena jusqu'à 12000 personnes. Cependant, cette activité a rapidement décliné jusqu'à devenir quasiment nulle dès les années 1920. Elle a ensuite stagné jusqu'en 1983, date à laquelle la relance de l'exploitation se réorganise suite à l'aboutissement des études géologiques et de prospection



Figure 1 : Carte de la Guyane. Source:Atlas illustré de Guyane, planche n°9, IRD Editions, 2001

minières effectuées par le BRGM. En 1999, la production officielle déclarée s'élève à un peu plus de 3 tonnes d'or brut par an. Cependant, en parallèle à l'activité aurifère légale qui emploie quelques 900 personnes actuellement, il existe de nombreuses exploitations clandestines dont il est bien sur difficile d'estimer la production ainsi que le nombre de personnes concernées (Picot *et al.*, 1995 ; Mouron *et al.*, 2001). Selon la DRIRE, l'activité minière clandestine emploierait environ 10 000 personnes avec une production de 35 tonnes d'or ces cinq dernières années. L'intensification de l'activité minière en Guyane depuis le début des années 1990 a amené l'ONF à mettre en place un programme de recherche visant à réhabiliter les zones dégradées par l'orpaillage. D'après les services concernés (Brigade Nature, ONF), l'orpaillage touche environ 200 ha de forêts ripicoles chaque année. Cette activité est extrêmement destructrice puisqu'elle conduit à une déforestation totale laissant les sols nus, lessivés, déstructurés et presque abiotiques. Les observations effectuées sur le site de Central Bief appartenant à la Compagnie Minière de Boulanger, site expérimental de revégétalisation géré par l'ONF (rapport Stéphane Guitet, 2004), montrent une végétation très pauvre et circonscrite dans certaines zones : la strate herbacée domine avec des tapis de Cypéracées et d'Andropogon (espèces adaptées à ces zones sous fortes contraintes hydriques) ; la strate arbustive est limitée à *Mimosa pudica* et *Boreria latifolia* ; quant à la strate arborée, elle se limite aux *Cecropia sp.* ayant un faible pouvoir couvrant et peu d'ancrage au sol.

Ces observations laissent craindre une dynamique de recolonisation naturelle très lente voire bloquée. Dans les zones dégradées et laissées à l'abandon, le lessivage important a pour conséquence une forte turbidité des eaux susceptibles de perturber les organismes aquatiques ; mais aussi une possible pollution par le mercure et les hydrocarbures utilisés lors de l'extraction. Les objectifs poursuivis par l'ONF dans son programme de restauration des sites dégradés sont donc de définir des itinéraires techniques de réhabilitation qui doivent permettre la facilitation et l'accélération de la recolonisation naturelle, afin non seulement de limiter les phénomènes d'érosion et de lessivage mais aussi de relancer la dynamique de succession végétale amenant à une réinstallation de la forêt. Cette réhabilitation passe par la plantation d'espèces végétales suffisamment robustes pour résister aux contraintes environnementales extrêmes. Les Légumineuses fixatrices d'azote sont de bons candidats car elles sont autonomes vis-à-vis de la nutrition azotée et capables d'enrichir le sol. Une espèce régulièrement utilisée dans les programmes de reboisement en zones tropicales est l'*Acacia mangium*, Mimosacée originaire de Papouasie/Nouvelle-Guinée. Des espèces locales, dont on a moins la maîtrise mais qui présentent l'intérêt d'être facilement accessibles, sont aussi testées.

2. Services aux sociétés:

Les changements climatiques globaux ainsi que l'augmentation des surfaces de terres dégradées (Doran, 2002) amènent à essayer de trouver des solutions environnementales à l'échelle globale. La nature des dommages causés aux écosystèmes est rendue plus facile à expliciter en utilisant le concept de services rendus par les écosystèmes aux sociétés humaines (d'ordre économique, social, culturel et environnemental). Ce concept est relativement récent, puisqu'il date de la fin des années 60 (King, 1966 ; Heliwell, 1969 ; Odum and Odum, 1972 in de Groot *et al.* (2002)) et tend à prendre de plus en plus d'importance (Costanza *et al.*, 1997 ; de Groot *et al.*, 2002). Costanza *et al.* (1997) définissent les services des écosystèmes de la manière suivante: *"ecosystems goods (such as food) and services (such as waste assimilation) represent the benefits human populations derive, directly or indirectly, from ecosystems functions"*. Cette définition a l'avantage d'inclure non seulement les écosystèmes naturels mais aussi les anthroposystèmes. Etant donné le nombre croissant d'études portant sur les bénéfices des systèmes naturels aux sociétés humaines, plusieurs modes de catégorisation ont été proposés afin de classer les nombreux services des écosystèmes existants, basés :

(1) - sur des groupements descriptifs tels que des services biotiques, biochimiques ou culturels comme Moberg & Folke (1999) les ont décrit sur les récifs coralliens. Dans cette étude, les auteurs distinguent les biens de ces systèmes - ressources renouvelables du type produits de la mer, exploitation de matériaux de ces récifs pour la construction - des services rendus par ces formations – maintien des structures, maintien des habitats, de la biodiversité, assimilation de déchets.

(2) - sur des groupements organisationnels tels que Norberg (1999) les présente. Ainsi, il distingue les services associés à certaines espèces ou groupes d'espèces similaires pour lesquels les services rendus sont internes à l'écosystème et souvent liés à la croissance et la maintenance de certaines espèces. La deuxième catégorie se compose des services régulant les entrées exogènes physiques ou chimiques, c'est-à-dire que le système ne peut pas gérer l'amplitude de ces entrées. Le maintien de ces services concerne l'ensemble de la communauté et de l'écosystème. Enfin, la dernière catégorie concerne les services associés à l'organisation des entités biotiques, c'est-à-dire des patterns, structures non aléatoires ou des réseaux d'interactions dans le temps ou l'espace. Les auteurs précisent bien que la classification des services des écosystèmes qu'ils proposent s'inscrit dans une perspective écologique et a pour but de favoriser la transdisciplinarité.

Fonctions	Processus et composants écosystémiques	Services
<i>Fonctions de régulation</i>	<i>Maintenance des processus écologiques essentiels et systèmes de support de la vie</i>	
Régulation du climat	Influence de la couverture de terres et de processus biologiques (e.g. production de DMS) sur le climat	Maintien d'un climat propice aux habitations, santé, cultures etc.
Approvisionnement en eau	Filtration, rétention et stockage d'eau douce (e.g. les aquifères)	Provision d'eau pour la consommation (boisson, irrigation, etc.)
Rétention du sol	Rôle du système racinaire végétal et des biotes du sol	Maintien des terres arables, prévention de l'érosion ou de l'envasement
Régulation des nutriments	Rôle des biotes dans le stockage et le recyclage des nutriments	Maintien de la santé des sols et d'écosystèmes productifs
<i>Fonctions d'habitats</i>	<i>Fourniture d'habitats pour les espèces animales et végétales</i>	
<i>Fonctions de production</i>	<i>Réserve de ressources naturelles</i>	
Nourriture	Conversion de l'énergie solaire en plantes comestibles et animaux	Fourrages, fertilisants, fuel, énergie, etc.
Matériaux vivants	Conversion de l'énergie solaire en biomasse pour les constructions humaines et autres	Améliorer la résistance des cultures aux pathogènes
Ressources génétiques	Matériaux génétiques et évolution chez les plants et animaux sauvages	Médicaments et Pharmacopée, modèles chimiques, etc.
<i>Fonctions d'information</i>	<i>Donner des opportunités pour le développement cognitif</i>	
Information spirituelle et historique	Variété des caractéristiques naturelles ayant une valeur spirituelle et historique	Utilisation de la nature à des fins religieuses et historiques
Science et éducation	Diversité de la nature ayant une valeur scientifique et éducative	Utilisation des systèmes naturels pendant les excursions scolaires, etc.

Tableau 1: Exemples de fonctions, biens et services dans les systèmes naturels et semi-naturels d'après Costanza *et al.* (1997) ; De Groot *et al.* (2000)

(3) - sur des groupements fonctionnels (de Groot *et al.*, 2002). Cette classification semble être la plus intégrative car elle s'attache à traduire l'extrême complexité des processus et structures des systèmes en un nombre plus limité de fonctions écosystémiques susceptibles de fournir des biens et services intéressants pour les sociétés humaines. De Groot *et al.* (2002) définit ainsi quatre grandes catégories qui permettent de rassembler les fonctions des écosystèmes et les services qu'ils rendent : fonctions de régulation, d'habitat, de production et d'information. Ces fonctions couvrent des domaines très différents ayant traits aussi bien à la sociologie, l'économie et l'environnement (tableau 1). L'objectif est de créer un cadre autorisant une évaluation des biens et services des écosystèmes pour une analyse comparative écologico-économique.

Ces trois types de classification visent donc à décrire les interactions entre l'environnement et les sociétés humaines. Cependant, ils sont opérationnels dans les deux sens : 1 - rôle des écosystèmes dans le bien-être de l'homme, 2 – impact des activités humaines sur le fonctionnement des écosystèmes (tableau 2). Alkire (2002) définit le bien-être des hommes comme étant le minimum de matériels nécessaires pour une vie convenable, l'expérience de la liberté, la sécurité personnelle, de bonnes relations sociales, ainsi que les conditions pour l'accomplissement physique, social, psychologique et spirituel. La réalisation de ce bien-être est intimement dépendant des écosystèmes via leurs services de production (nourriture, eau douce, énergies, ressources génétiques et biochimiques), de régulation (régulation du climat, des inondations, des maladies), et culturels (spiritualité, esthétique, symbolique, éducation). L'impact des sociétés humaines sur les systèmes écologiques a énormément augmenté ces dernières décennies et les changements induits vont affecter les hommes à plusieurs niveaux : altération des réserves de nourriture et autres biens, modification de la qualité de l'eau et de l'air, altération de la biodiversité et de ses habitats. Ces transformations importantes des écosystèmes et des services qu'ils rendent aux sociétés humaines sont susceptibles d'augmenter les tensions, et d'amener à des conflits (Homer-Dixon, 1994). La clarification des liens existant entre les services des écosystèmes et les différentes composantes du bien-être humain doit aider les instances décisionnelles à prendre des décisions informées (Duraiappah, 1998).

Comme nous l'avons vu, différentes logiques ont été utilisées pour classer les services des écosystèmes. D'une façon plus générale, on peut distinguer trois grands groupes : les services d'ordre socio-économiques, culturels et environnementaux. La quasi-totalité des services environnementaux est d'assurer le maintien de l'équilibre des cycles biogéochimiques. C'est ce point que nous allons maintenant développer.

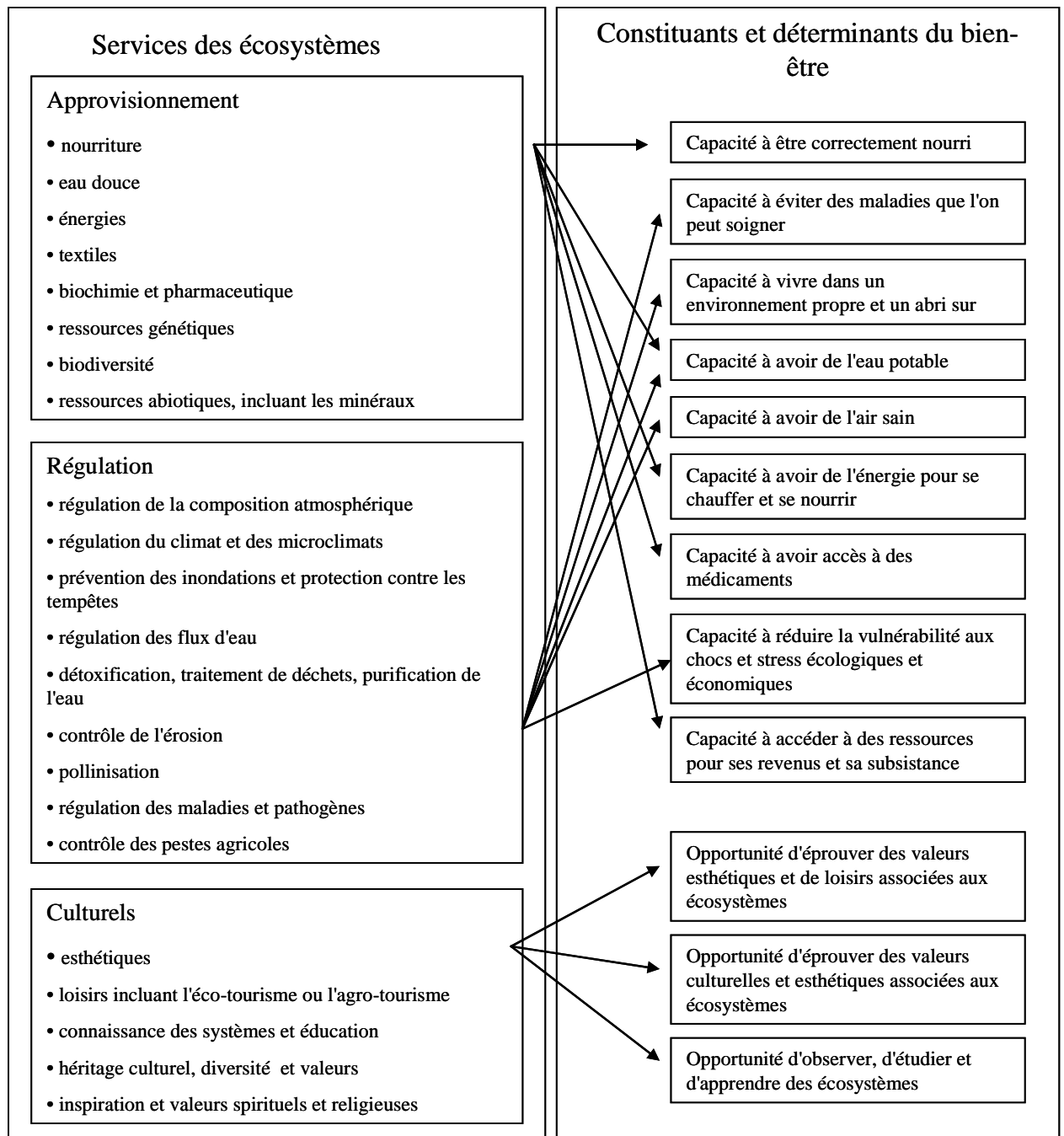


Tableau 2: Liens entre les services des écosystèmes et les différents constituants et/ou déterminants du bien-être (d'après Duraiappah, 2002)

1.1. Un service environnemental : le maintien des cycles biogéochimiques

Ces cycles sont assurés, dans leur majorité, par des fonctions biologiques - le terme fonction étant ici utilisé au sens de biotransformations uniquement (c'est-à-dire le passage d'un élément d'une forme moléculaire à une autre avec modification de son niveau d'oxydation). Les cycles biogéochimiques majeurs sont ceux de l'oxygène, du carbone, de l'azote et de l'hydrogène – ils représentent 95 % de la composition des êtres vivants. Les 5 % restants concernent le phosphore, le soufre, le chlore, le sodium, le potassium, le calcium et le magnésium ; leur importance quantitative ne présument pas de l'importance de leur rôle dans l'élaboration de la matière vivante (Lévêque, 2001, p353).

Les modifications des cycles de l'azote et du carbone sont celles qui entraînent potentiellement les conséquences les plus importantes pour l'environnement. Dans les deux cas, les processus les plus associés aux enjeux environnementaux sont ceux qui génèrent des échanges entre biosphère et atmosphère, à savoir pour le carbone photosynthèse et respiration et pour l'azote l'ensemble des processus microbiens du sol. Ce sont donc ces deux cycles qui seront développés, et compte-tenu du contexte de la thèse, les exemples cités concerneront surtout les écosystèmes forestiers.

1.1.1. Le cycle du carbone:

Le carbone constitue moins de 1% de la masse de l'écorce terrestre mais c'est un des éléments majeurs du monde du vivant. En effet, le passage du CO₂ minéral au monde organique *via* la photosynthèse est la réaction clé de la vie sur terre. Il existe un certain nombre de réservoirs dans lesquels le carbone est présent sous différentes formes : le dioxyde de carbone libre dans l'atmosphère ou dissous dans l'eau, la biomasse vivante ou morte, les sédiments carbonatés, les carburants fossiles, etc. Le stockage et le relargage du carbone à la surface terrestre du fait de la photosynthèse et de la respiration sont permanents et saisonniers. Les écosystèmes forestiers représentent d'immenses réservoirs de carbone et sont des acteurs importants de l'évolution de l'atmosphère terrestre car la teneur en CO₂ dépend de l'équilibre respiration-photosynthèse (Lévêque, 2001). Le cycle du carbone dans ces écosystèmes est résumé dans la figure n°1. Les différentes composantes le constituant sont : l'assimilation par la photosynthèse, le relargage par la respiration des végétaux, le transfert dans les sols sous forme de débris et composés

organiques, l'exsudation de composés organiques dans la rhizosphère et le relargage éventuel vers l'atmosphère. La production végétale primaire nette – c'est-à-dire la différence entre la photosynthèse et la respiration - a été évaluée dans de nombreux écosystèmes terrestres (Chambers *et al.*, 2004 ; Field & Kaduk, 2004 ; Harmon *et al.*, 2004 ; Kolari *et al.*, 2004; Rice *et al.*, 2004 ; Van Dijk & Dolman, 2004). Ainsi, le bilan de carbone a été quantifié en forêt amazonienne et l'étude conclut que la moitié de la production brute ($30,4 \text{ t C}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$) correspond à la respiration ($15,6 \text{ t C}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$) alors que l'autre moitié correspond à la quantité de carbone fixée dans les tissus (Malhi & Grace, 2000). Cependant, il est maintenant admis que cela a entraîné une sous-évaluation de la production nette des forêts tropicales du fait du manque de précision de l'estimation de la croissance racinaire et de l'exsudation (Malhi & Grace, 2000 ; Houghton *et al.*, 2001). Une meilleure estimation du bilan carboné dans le compartiment racinaire pourrait aider à mieux comprendre l'impact du réchauffement global sur les écosystèmes forestiers et à quantifier de manière fine la séquestration de carbone due à l'activité des forêts tropicales.

On estime aujourd'hui que 60 % du réchauffement global constaté sont dus à l'augmentation de concentration du dioxyde de carbone de $280 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ avant la révolution industrielle à $360 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ actuellement (Grace, 2004). Les principales causes de cette augmentation sont la combustion des carburants fossiles dues aux activités humaines et à l'industrialisation exponentielle qui a eu lieu depuis la fin du XVIII^{ème} siècle, mais aussi la déforestation des forêts tropicales (Chapin III *et al.*). Sala *et al.* (2000) prévoient que le changement d'usage des terres, ainsi que le changement du climat et l'augmentation de la concentration des gaz dans l'atmosphère (entre autres, le CO_2) vont avoir un impact très fort sur la biodiversité des écosystèmes terrestres dans les années à venir, et en particulier dans les tropiques. Les dernières études montrent que la déforestation des forêts tropicales diminue légèrement (Houghton *et al.*, 2001), mais il est maintenant reconnu que les forêts gérées ou réhabilitées fixent moins de carbone que des forêts matures naturelles (Buchmann & Schluze, 1999).

Il est actuellement attesté que l'augmentation de la concentration de CO_2 induit une augmentation de la productivité primaire nette de certaines espèces végétales, et par voie de conséquences va ainsi accroître les quantités de carbone respirées par les végétaux et les microorganismes du sol. De plus, Rillig *et al.* (1999) ont montré que l'augmentation de la disponibilité en carbone dans les sols modifiait la structure de ces sols probablement *via* la production de substances agglomérantes comme la glomaline produites par les champignons. Ces auteurs préconisent de tenir compte de ce facteur dans les bilans globaux eu égard à l'importance de la structure dans les processus microbiens d'un sol.

1.1.2. Le cycle de l'azote:

Contrairement au cycle du carbone dans lequel le dioxyde de carbone joue un rôle central, le cycle de l'azote se particularise par sa grande complexité et le nombre important de molécules différentes y jouant un rôle (figure n°2). Ainsi on distingue plusieurs formes minérales – azote moléculaire (N_2), ammoniac (NH_3), nitrite (NO_2^-), nitrate (NO_3^-), ammonium (NH_4^+), oxyde nitrique (N_2O) et oxyde nitreux (NO) mais aussi des formes organiques très variées (acides aminés, urée, acide urique, protéines, etc.); chaque forme ayant un rôle particulier dans l'écosystème. L'azote est majoritairement présent sous forme gazeuse dans l'atmosphère (80%), les autres réservoirs sont la biomasse puis la matière organique et les océans (Lévêque, 2001). Le passage entre l'atmosphère et la biomasse se fait exclusivement *via* la fixation biologique grâce aux cyanobactéries, aux bactéries impliquées dans la fixation symbiotique (*Rhizobium*, *Frankia*), aux bactéries impliquées dans la fixation associative (*Azospirillum*) et aux bactéries impliquées dans la fixation libre (*Azotobacter*, *Clostridium*). Elle représente 50% de la source d'azote des systèmes terrestres. Un autre processus majeur de ce cycle biogéochimique est la minéralisation, qui correspond à la phase de décomposition de la matière organique aboutissant aux nitrates. Une des étapes clé est effectuée par les bactéries nitrifiantes, seuls organismes capables d'oxyder les ions ammoniums en nitrates facilement assimilables par les plantes et les microorganismes. Enfin, un autre processus clé est la dénitrification, qui boucle le cycle et qui correspond à la réduction des nitrites et nitrates en azote moléculaire.

Pour la majorité des végétaux, l'azote est un élément fortement limitant car peu disponible. Son acquisition se fait principalement selon deux voies d'entrées : le sol à travers l'assimilation des formes minérales ou l'atmosphère à travers la fixation de l'azote moléculaire. Les sociétés humaines ont utilisé depuis très longtemps la fertilisation azotée pour améliorer les rendements des cultures et arriver à une suffisance alimentaire. Cela passait par l'apport de fumiers végétaux ainsi que la plantation de Légumineuses fixatrices enrichissant le sol en azote (cultures en rotation ou associatives) (Vance, 2001). Au cours du XX^{ème} siècle, la population humaine ayant augmentée de manière exponentielle, sa survie a été largement dépendante d'une avancée majeure qui a permis d'accroître de manière significative la quantité de nourriture disponible : la synthèse de l'ammonium et l'apparition des fertilisants industriels. Le processus de synthèse de l'ammonium selon le procédé de Haber-Bosch découvert à la fin du XIX^{ème} siècle a été commercialisé de manière importante après la Seconde Guerre Mondiale. Actuellement, selon les estimations, environ 175 millions de tonnes d'azote circulent à travers les différentes cultures dans le monde chaque année. De ce fait, un tiers de l'apport protéique de l'alimentation humaine dépend des fertilisants azotés synthétiques (Smil, 1997). A travers la production de fertilisants

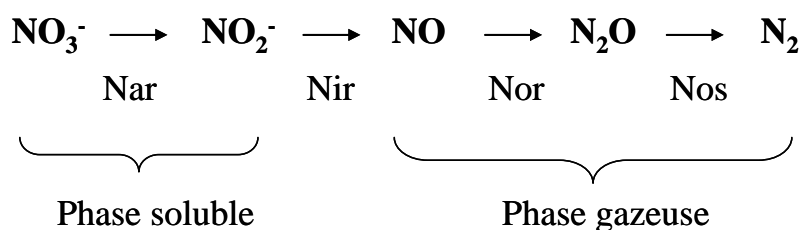
azotés synthétiques, la combustion des carburants fossiles et les cultures de Légumineuses fixatrices réalisées de manière intensive, les activités humaines modifient fortement le cycle de l'azote global. Selon Vitousek *et al.* (1997), le changement fondamental majeur du à l'homme porte sur le processus de fixation d'azote (doublement du transfert d'azote de l'atmosphère vers les sols). Les modifications engendrées affectent aussi bien l'atmosphère que les systèmes aquatiques et terrestres. Ainsi, des émissions de gaz traces tels que l'oxyde nitreux, l'oxyde nitrique et l'ammoniac augmentent en parallèle de manière directe (combustion des carburants fossiles et autres processus à hautes températures) ou indirecte (volatilisation de l'ammonium ou dénitrification des apports azotés agricoles) (Vitousek *et al.*, 1997). Par ailleurs, ces émissions accrues d'azote provoquent une augmentation des dépôts sur les terres et les océans. Dans les écosystèmes terrestres, l'enrichissement en azote provoque une augmentation des biomasses et la question est de savoir dans quelle mesure cet apport d'azote entraîne une augmentation de la photosynthèse, donc un stockage de carbone. En effet, cela pourrait aider à expliquer que les teneurs en CO₂ accumulées dans l'atmosphère sont inférieures à celles auxquelles on pourrait s'attendre eu égard aux quantités émises, l'augmentation des concentration en azote ayant pour conséquences une augmentation des capacités de séquestration du carbone dans la biosphère (Schimel *et al.*, 1995). Le phénomène de saturation en azote a été décrit comme le changement du cycle de l'azote des écosystèmes forestiers et correspond à la levée des limitations des fonctions biologiques dues à cet élément sont supprimées par des apports (Agren & Bosatta, 1988 ; Aber, 1992 ; Vitousek *et al.*, 1997). L'importance de ce phénomène est étroitement liée aux changements d'usage des terres, de climat, de teneurs en CO₂ et O₃ et autres facteurs à variations rapides. Dans les écosystèmes aquatiques, de nombreuses études aux Etats-Unis et en Europe ont montré les conséquences d'une augmentation des concentrations en 'azote dans les eaux (Hedin *et al.*, 1995 ; Justic *et al.*, 1995 ; Howarth *et al.*, 1996). L'eutrophisation qui en résulte entraîne une croissance accélérée d'algues et de cyanobactéries dont la décomposition provoque l'hypoxie ou l'anoxie du système entraînant ainsi une perte de diversité.

1.1.3. La dénitrification : actrice et bioindicatrice du fonctionnement du sol:

Nous détaillons la dénitrification dans la mesure où ce processus a été utilisé comme l'étape modèle du cycle de l'azote de la partie expérimentale de ce travail. En effet, en raison de ces caractéristiques biologiques, la dénitrification est potentiellement un bioindicateur particulièrement intéressant pour évaluer l'impact de perturbations et prédire les évolutions futures du système sol. C'est un processus de régulation du cycle qui présente d'autre part l'avantage d'être porté par une très grande diversité de microorganismes, d'être facilement mesurable et d'avoir fait l'objet de très nombreuses études. Nous avons tenté par ailleurs de nous placer dans une approche

écologique, c'est-à-dire de mieux cerner l'influence de la dénitrification dans le fonctionnement des écosystèmes et les impacts des modifications d'utilisation des terres sur cette fonction et sur ses acteurs.

La dénitrification est la biotransformation qui permet la conversion du nitrate (NO_3^-) et du nitrite (NO_2^-) en oxyde nitrique (NO), oxyde nitreux (N_2O) et azote atmosphérique (N_2). Les auteurs s'accordent pour dire que quatre enzymes sont impliquées (Tiedje, 1984b ; Zumft, 1997; Cavigelli & Robertson, 2000 ; Cavigelli & Robertson, 2001):



Ces enzymes sont la nitrate réductase (Nar), la nitrite réductase (Nir), l'oxyde nitrique réductase (Nor) et l'oxyde nitreux réductase (Nos) ; elles sont activées séquentiellement lors de conditions anaérobies. Un schéma conceptuel de régulation de ce processus classant les facteurs selon un gradient distal-proximal est présenté en figure 3 (Tiedje, 1984b ; Firestone & Davidson, 1989) Il semble par ailleurs que l'oxyde nitreux réductase soit l'enzyme la plus sensible à certains paramètres environnementaux qui régulent à la fois sa synthèse et de son activité. De ce fait, ces paramètres influencent les proportions de N_2O et de N_2 produits : l'humidité du sol (Bergsma *et al.*, 2002), le pH (Tiedje, 1984b), la disponibilité en carbone, nitrate et nitrite (Tiedje, 1984b ; Robertson *et al.*, 2000), la structure des pores (Parry *et al.*, 1999), des épisodes de gel-dégel (Röver *et al.*, 1998 ; Müller *et al.*, 2002b).

Les microorganismes qui portent cette fonction sont essentiellement des bactéries qui sont extrêmement diverses avec des caractéristiques physiologiques très variées. Les dénitrifiants les plus fréquents appartiennent aux sous-classes α et β des Protéobactéries, et sont généralement des hétérotrophes aérobies capables de transférer leurs électrons d'une source de carbone vers un oxyde d'azote en conditions anaérobies (Zumft, 1997). Jusqu'à présent considéré comme un processus uniquement procaryote, plusieurs études récentes ont montré que certains Champignons ou Levures étaient capables de dénitrifier (Shoun & Tanimoto, 1991 ; Shoun *et al.*, 1992 ; Laughlin & Stevens, 2002).

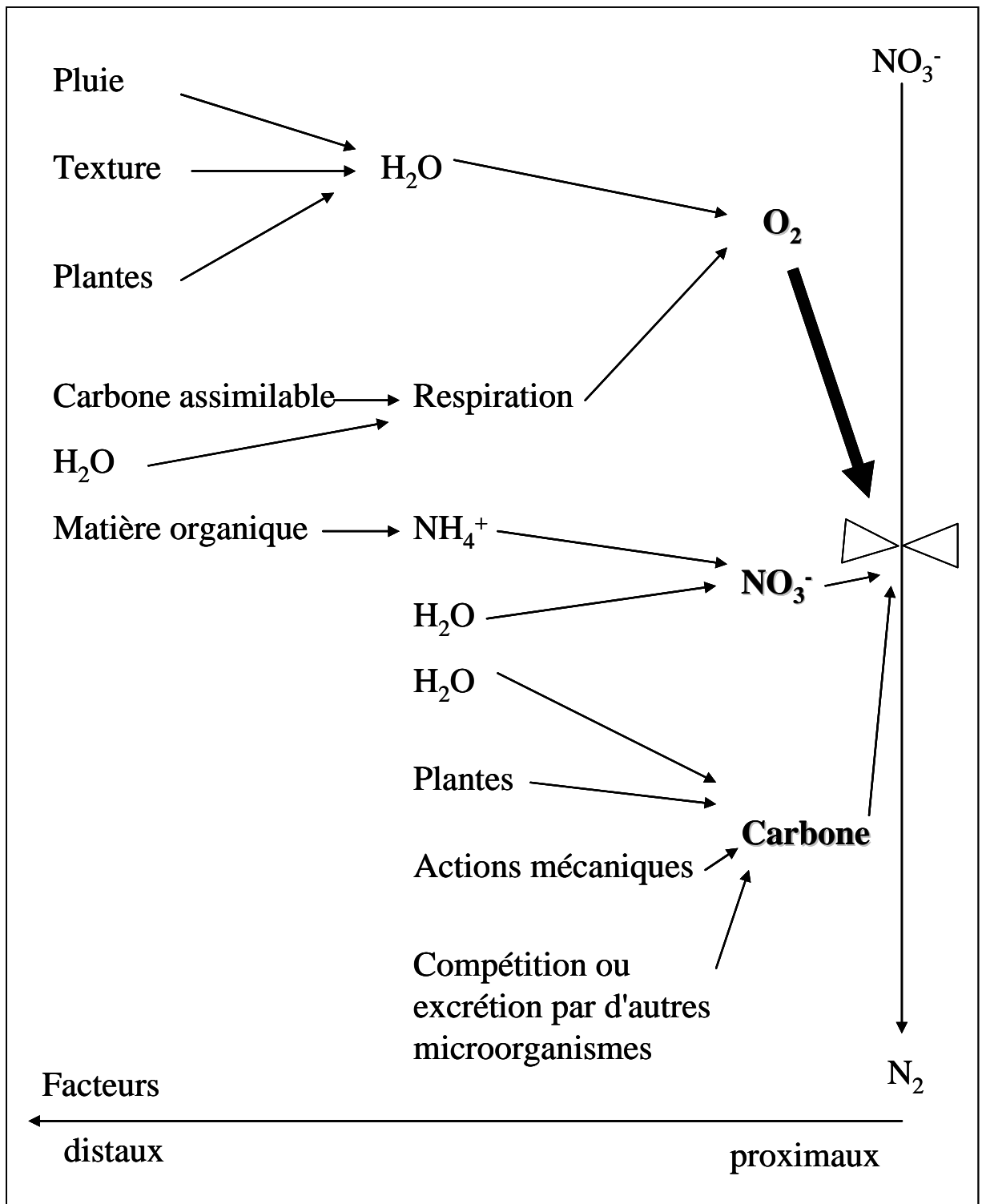


Figure 1: Représentation schématique de la régulation de la dénitrification en fonction de la notion de proximité des paramètres de régulation, d'après Tiedje (1984b) et Firestone & Davidson (1989)

D'un point de vue écologique, la dénitrification a un impact direct sur la disponibilité du sol en azote et finalement sur la productivité primaire nette de nombreux écosystèmes terrestres et côtiers (mangroves par exemple). Ce processus est aussi à l'origine de la majeure partie du dioxyde d'azote atmosphérique (Firestone & Davidson, 1989), qui est un gaz à effet de serre et un catalyseur naturel de la dégradation de l'ozone stratosphérique (Rasmussen & Khalil, 1986), et dont la concentration est en augmentation régulière d'environ $0.8 \text{ m}^3 \cdot 10^9 \text{ m}^{-3}$ annuellement (Houghton *et al.*, 1996). De plus, il est maintenant connu que les sols sont des puits et/ou des sources d'émissions de N_2O , N_2 et NO significatifs. Les flux de N_2O et NO entre sol et atmosphère sont le résultat d'activités microbiennes complexes et mal comprises qui s'effectuent simultanément dans les sols (Conrad, 1996). Mieux comprendre les déterminismes des flux, l'influence des facteurs environnementaux sur les communautés microbiennes à l'origine de ces gaz s'avère donc primordial, en particulier dans l'optique d'essayer de modéliser les flux pour prévoir leur modification lors de perturbations consécutives, par exemple, aux changements d'usage des terres.

Les études et publications relatives à la dénitrification sont nombreuses et montre l'importance de cette fonction microbienne à la fois dans le fonctionnement des écosystèmes comme dans les émissions de gaz à effet de serre. Cette importance justifie des efforts supplémentaires pour comprendre sa régulation par les facteurs environnementaux. Ces efforts se situent à la fois en amont (comprendre ce qui régule) et en aval (comprendre ce qui est régulé). En d'autres termes, il est nécessaire d'identifier :

- les déterminants réels de variables de régulation complexes. Par exemple Le Roux *et al.* (2003) ont montré l'influence du régime d'herbivorie sur le niveau de dénitrification dans un écosystème prairial semi-naturel. Dans cette étude, les résultats montrent que la composition spécifique des plantes n'est pas le facteur principal responsable des variations constatées mais que celles-ci seraient plutôt dues au piétinement, à l'apport d'azote par les excréments d'animaux, à des modifications de consommation d'azote et à l'exsudation de carbone plus importante lorsque les plantes sont régulièrement défoliées. En effet, la dénitrification étant une fonction réalisée par des organismes hétérotrophes, elle peut être limitée ou augmentée par la disponibilité des substrats carbonés et leur aptitude à être réorganisés en substances organiques plus complexes (Murray *et al.*, 2004).
- Les composantes de la communauté dénitrifiante affectées par facteurs environnementaux. Maron *et al.* (2003) ont en effet distingué trois composantes - densité, diversité, fonctionnalité - et ont montré que l'environnement n'exerçait pas une régulation de même nature sur ces trois composantes. De même, Cavigelli et Robertson (Cavigelli & Robertson, 2000 et 2001) ont montré que deux sols ayant des caractéristiques physico-chimiques et

historiques différentes étaient susceptibles de contenir des communautés dénitrifiantes dont la composition et le fonctionnement étaient différents malgré des index de diversité similaires. Les différences de composition des communautés expliqueraient à elles-seules les émissions de N₂O. Enfin, la différence de gestion (agriculture intensive ou succession naturelle végétale) de sols provenant de la même zone géomorphologique est susceptible de modifier la diversité génétique des communautés dénitrifiantes, diversité évaluée à l'aide du gène de fonction *nosZ* codant pour la N₂O-réductase (Stres *et al.*, 2004). Le changement d'usage des terres comme les pratiques agricoles intensives amènent à des modifications importantes des communautés microbiennes des sols liées au cycle de l'azote et en particulier à celle susceptibles de dégager du N₂O, et ceci aussi bien dans leur diversité génétique, leur composition spécifique que dans leur fonctionnement.

La prise en compte de la dénitrification, en tant que processus, dans des modèles d'émission de NO et de N₂O donne à ce jour des résultats peu satisfaisants (Parton *et al.*, 1995). Ceci est du pour une part importante, semble-t-il, à l'extrême variabilité spatiale du processus à différentes échelles : macro (Dendooven *et al.*, 1996) et micro (Parry *et al.*, 1999). L'amélioration de la qualité des modèles passe par une meilleure compréhension du déterminisme de cette variabilité spatiale ; qui passe elle-même par l'approche hiérarchisée amont-aval évoquée ci-dessus.

3. Ingénierie écologique:

Charles & Bernard (2003) définissent l'ingénierie écologique comme une "intervention sur les écosystèmes à partir de la connaissance acquise de leur fonctionnement pour en modifier ou en réguler différents aspects en vue de finalités établies à l'avance." Elle permet la connection entre les sociétés et l'environnement et s'appuie non seulement sur des technologies trouvées pour résoudre les problèmes mais aussi sur la propension des écosystèmes à s'adapter à des conditions particulières, avec l'idée d'une performance maximale (Odum & Odum, 2003). Cette discipline est née du développement de l'innovation et de l'ingéniosité des hommes afin de répondre à des besoins sociétaux dans le but d'améliorer la qualité de la vie. La nécessité d'une telle discipline se présente lorsque la nature ne remplit plus les différents services que les sociétés humaines lui demandent (Gattie *et al.*, 2003). Elle est donc fondamentalement liée aux notions de gestion et de réparation et répond indirectement à des demandes sociales et politiques de tous ordres (Charles & Bernard, 2003). De nombreuses études ayant trait à la réhabilitation, la restauration, la conservation, etc., mais aussi les connaissances dans les champs de l'écologie théorique et expérimentale ont aidé à l'élaboration des bases conceptuelles de cette discipline. Cependant, les spécificités des systèmes écologiques et en particulier leur comportement

dynamique distingue l'ingénierie écologique des autres domaines de l'ingénierie (Allen *et al.*, 2003).

L'ingénierie écologique n'est en fait qu'une étape supplémentaire dans l'intervention de l'homme sur la nature. Elle rejoint les pratiques séculaires et souvent empiriques qui ont conduit à une anthropisation progressive des milieux naturels. Cependant, son échelle d'action est beaucoup plus large que par le passé du fait de l'explosion des moyens techniques apparus à la suite de la révolution industrielle. Ainsi, l'homme devient responsable de l'avenir de la planète (Lévêque *et al.*, 2003). Le concept d'anthrosystème défini par Lévêque *et al.* (2003) recentre l'objet d'étude sur les interactions entre la dynamique des systèmes naturels ou non et celle des sociétés humaines et leurs évolutions. Il induit alors par définition une question centrale qui est celle du développement durable, c'est-à-dire la gestion des écosystèmes et des ressources naturelles par les groupes sociaux dans une perspective de maintien et de réparation.

Cette notion de gestion inhérente à l'ingénierie écologique semble indissociable de celle de services rendus par les écosystèmes développée plus haut. En effet, le concept de biens et services établit bien un pont entre écologie et économie, et pose la question de la réparation lorsque ces services sont altérés par l'activité humaine. Ainsi, la gestion des ressources économiques et écologiques se doit alors de remplir deux fonctions complémentaires – assurer le maintien des fonctions des écosystèmes et assurer le bien-être économique par la production des services des écosystèmes (Faucheux & Martin, 2003).

La gestion d'un écosystème implique souvent des compromis, c'est-à-dire la préférence de certains services au détriment d'autres. Ainsi, la notion de "santé de l'écosystème" est difficile à aborder. En effet, cela suppose l'utilisation d'une référence dont les critères seront forcément définis à partir des services que nous désirons de l'écosystème lui-même. Cependant, il est possible d'évaluer l'état d'un écosystème au regard de la production des services individuels qu'il procure. Slocombe (1998) distingue la santé d'un écosystème de l'intégrité écologique : la santé d'un écosystème est basée sur les caractéristiques fonctionnelles et les connaissances de la structure de l'écosystème, mais sous-entend la notion de stress ; alors que l'intégrité souligne le maintien de l'organisation du système et son potentiel évolutif. Costanza *et al.* (1997) définissent un écosystème "en bonne santé" s'il est stable et durable, c'est-à-dire actif et capable de maintenir son organisation et autonomie dans le temps. Alors que Karr & Dudley (1981) définissent "l'intégrité" d'un écosystème comme la capacité à supporter et maintenir une communauté d'organismes équilibrée, intégrée, adaptative, ayant une composition spécifique, une diversité et une organisation fonctionnelle comparable à celle d'un habitat naturel de la région. Les deux notions diffèrent donc majoritairement par l'intégration ou non de l'équilibre dans leur définition.

Malgré tout, ce sont des conceptions importantes à la fois pour la communauté scientifique mais aussi en tant que moyens de communication au public.

4. Bioindicateurs :

Les notions précédemment développées d'ingénierie écologique impliquent la détermination et l'utilisation d'indicateurs capables de caractériser, de renseigner, de prédire le maintien et les modifications pouvant subvenir dans les écosystèmes. Ces indicateurs peuvent être de nature très différentes et avoir des objectifs multiples.

Ils peuvent être de nature biologique, physique, chimique mais aussi agronomique, agricole, sociologique. Ce sont également des outils intéressants lorsque des mesures directes ne sont pas possibles (Bockstaller *et al.*, 1997). Merckle & Kaupenjohann (2000) précisent qu'un indicateur doit être une variable mesurable qui caractérise les systèmes ou les composants des systèmes en réduisant la complexité et en intégrant l'information. Les indicateurs écologiques se doivent d'être capables de rendre compte de la complexité de l'écosystème tout en restant suffisamment simple pour être mesurés facilement et en routine. Il est donc nécessaire de définir des critères permettant de sélectionner des indicateurs écologiques potentiels (tableau 3, (Dale & Beyeler, 2001)).

Être facilement mesurable
Être sensible aux stress sur le système
Répondre au stress de manière prédictible
Être anticipatif : signifier un changement imminent dans le système écologique
Prédire les changements pouvant être écartés par des actions de management
Être intégratif : l'ensemble des indicateurs donnent une mesure de la couverture des gradients clé à travers les systèmes écologiques
Avoir une réponse connue à des perturbations naturelles, stress anthropogéniques, et des changements dans le temps
Avoir une faible variabilité dans la réponse

Tableau 3: Critères définissant un indicateur écologique d'après Dale & Beyeler, (2001)

1.2. Qualité du sol et restauration :

Le sol est un compartiment des écosystèmes terrestres naturels ou anthropisés qui est maintenant reconnu comme une véritable composante environnementale qu'il est nécessaire de prendre en compte lorsque l'on parle de gestion durable. Cette prise en compte s'est accompagnée

de la constatation que le sol ne constitue pas une ressource inépuisable et qu'il faut donc la gérer voire la restaurer. La définition de critères permettant de déterminer la qualité d'un sol est devenue indispensable et a été réalisée à travers de nombreux travaux, ces indices étant souvent liés à des tentatives destinées à évaluer la durabilité des activités et des usages des terres (Nortcliff, 2002). Cependant, cette démarche, qui a été menée à travers de nombreux programmes nationaux ou internationaux de gestion durable et d'aménagement des terres, a aussi souligné un manque de consensus sur la définition de la "qualité d'un sol" ; les différences venant du fait que cette notion peut varier selon les objectifs à atteindre : il peut s'agir à la fois de fertilité, de productivité, de qualité environnementale des sols ou alors de détoxification de sols contaminés. Le concept de "qualité d'un sol" est souvent employé et défini dans le contexte de la production agricole et donc sous-entend des mesures de gestion durable et de conservation afin de maintenir l'activité dans le long-terme. Ainsi, Karlen *et al.* (1997) définissent cette notion comme : "*the fitness of a specific kind of soil to function with its surroundings, support plant and animal productivity, maintain or enhance water and air quality and support human health and habitation*". Cependant, cette notion de qualité ou de santé d'un sol peut aussi s'appliquer dans un contexte plus généraliste n'ayant pas forcément de liens directs avec la gestion durable, l'agriculture ou d'autres activités humaines. Ainsi, Doran & Safley (1997) donnent une définition beaucoup plus large et parle de capacité continue d'un sol à fonctionner comme un système vivant, à supporter une productivité biologique, à promouvoir la qualité de l'air et de l'eau, à maintenir la santé des plantes, animaux et hommes. Etant donné la place prépondérante qu'occupent les microorganismes dans le sol et le rôle fondamental qu'ils jouent dans son fonctionnement, ceux-ci sont très largement utilisés comme des indicateurs de la qualité et la santé d'un sol. En effet, ils remplissent les critères nécessaires à l'élaboration d'un indicateur efficace : capacité à définir les processus d'un écosystème, intégration des propriétés physiques, chimiques et biologiques, sensibilité à la gestion et aux variations climatiques, accessibilité et utilité pour le monde agricole, les producteurs, conservationnistes et centres de décisions (Doran & Zeiss, 2000). Il est essentiel cependant de prendre en compte la complexité du système sol, et de l'énorme diversité taxonomique, métabolique et structurale qu'il représente. De fait, il semble alors impossible de trouver un indicateur unique susceptible de remplir les critères définis plus haut et susceptibles d'intégrer cette complexité ; le concept de "qualité" ou de "santé du sol" doit donc être abordé *via* un certains nombres d'indicateurs biologiques mais aussi abiotiques. Bloem *et al.* (2003) préconisent ainsi d'utiliser les mesures de biomasse, de respiration mais aussi de minéralisation de l'azote, de diversité microbienne et de groupes fonctionnels de la faune du sol en tant qu'indicateurs. Par ailleurs, Schloter *et al.* (2003) considèrent que l'ensemble d'indicateurs à prendre en compte doit se référer aux cycles de l'azote et du carbone (*'driving forces' for C and N cycling*). Dans le même

esprit, White *et al.* (1998) ont montré qu'il était possible d'évaluer l'état de restauration de sites dégradés à l'aide d'un ensemble d'indicateurs d'origine microbienne. L'impact de l'aménagement peut alors être estimé à l'aide de profils établissant la taille de la communauté, sa composition fonctionnelle, son activité et son statut physiologique. De plus, des travaux ont montré que certaines caractéristiques du sol telles que la profondeur, la matière organique, la respiration, l'agrégation, la disponibilité en nutriments ou la capacité de rétention pouvaient constituer des indicateurs pertinents du fait de leur capacité à renseigner sur la "performance" du sol à permettre une production ou certaines fonctions environnementales (Arshad & Martin, 2002). Les paramètres prenant en compte ces interrelations biotiques-abiotiques semblent appropriés. De même, certains auteurs préconisent l'utilisation de la biodiversité comme un indicateur pertinent du fonctionnement d'un écosystème et de sa durabilité (Beare *et al.*, 1995 ; Giller *et al.*, 1997 ; Anderson, 2003).

Les concepts et les notions de "qualité d'un sol" et de bioindicateurs sont évidemment directement impliqués dans le contexte de la restauration de terrains dégradés et en particulier dans la reforestation. La dégradation des terres est une préoccupation majeure de nombreux pays à travers le monde et Daily (1995) estime que 43 % des terres émergées de la planète sont limitées dans leur capacité à répondre aux besoins des sociétés humaines du fait d'usages inappropriés : conversions des forêts en terres agricoles, utilisations pour l'élevage extensif, surexploitations forestières, technologies de production agricoles inaptes, activités industrielles.

Dans les régions tropicales, les programmes de reforestation se basent souvent sur la plantation d'espèces forestières natives ou exotiques dans le but de rétablir rapidement une couverture forestière mais aussi de faciliter la succession naturelle de la forêt (Hutton, 1982 ; Hulugalle, 1992 ; Lugo, 1992 ; Parrotta, 1992 ; Bernhard-Reversat, 1993 ; Lamb & Lawrence, 1993 ; Parrotta, 1993 ; Brown & Lugo, 1994 ; Bradshaw, 1997 ; Hüttl & Schneider B U, 1998 ; Parrotta & Knowles, 2001). Au Brésil par exemple, les programmes de reforestation mis en place en particulier dans des zones d'exploitation de la bauxite utilisent plusieurs techniques de plantation qui sont toujours précédées d'une préparation du sol par une remise en place de la couche superficielle : soit la plantation d'espèces locales en mélange choisies pour leurs caractéristiques de croissance rapide ; soit la plantation d'espèces exotiques déjà éprouvées dans d'autres régions du monde, les *Acacia spp* ou les *Eucalyptus spp* en particulier (Parrotta & Knowles, 2001).

1.3. Adéquation microorganismes-bioindication:

Les particularités biologiques des microorganismes nous obligent à nous poser des questions sur la démarche à adopter pour arriver à les utiliser de la manière la plus efficace

possible en tant que bioindicateurs du fonctionnement global du système sol. De plus, cela nous permet de préciser les logiques expérimentales que nous avons utilisées tout au long de ce travail. De par la taille des microorganismes, il est possible d'analyser d'un grand nombre de microcosmes ou d'échantillons prélevés sur le terrain. De plus, la manipulation d'un grand nombre d'organismes est facile (par exemple, introduction dans des microcosmes de sol stériles) (Jessup *et al.*, 2004). Par ailleurs, leur très grande diversité métabolique permet de distinguer un nombre important de communautés microbiennes fonctionnelles. Ceci autorise l'utilisation simultanée de plusieurs de ces communautés dans le but d'affiner la description du fonctionnement global. Comme nous l'avons vu précédemment, il est possible de caractériser, au sein de ces communautés fonctionnelles, trois composantes majeures : densité, diversité, fonctionnalité (Maron *et al.*, 2003). Lorsqu'il s'agit de rendre compte de modifications de fonctionnement du système sol, il est alors possible de hiérarchiser ces trois variables tout en privilégiant la variable la plus fonctionnelle : la fonctionnalité ou fonction potentielle. Les deux autres variables ont alors pour rôle d'affiner les informations apportées par la fonctionnalité. Par exemple, cela permet d'utiliser un biodescripteur plus élaboré tel que la relation structure-fonction.

Enfin, si la comparaison de l'intensité d'une fonction potentielle donnée (entre traitements, sites, saisons, etc.) renseigne sur des variations quantitatives positives ou négatives du fonctionnement global du système, les variations des relations entre deux fonctionnalités différentes et/ou entre structure et fonction vont renseigner sur des modifications d'ordre qualitatives.

Chapitre 2 :

Impact de la revégétalisation sur la récupération des fonctions biologiques du sol : cas de la réhabilitation d'un site minier

Tout au long de ce travail, nous avons choisi d'étudier l'impact de perturbations sur l'écosystème forestier tropical en considérant la composante microbienne du sol, à travers l'étude de deux fonctions, la respiration et la dénitrification caractérisées par leurs capacités fonctionnelles. Dans ce chapitre, les questions posées étaient:

- Après une perturbation, et dans un schéma de réhabilitation de l'écosystème vers un écosystème forestier diversifié, le type de végétation est-il prépondérant sur le substrat dans la reprise de fonctionnement du système sol et la récupération des fonctionnalités majeures du sol ?

- D'autre part, les variables de réponses observées ont-elles une évolution parallèle dans le schéma expérimental élaboré?

Pour répondre à ces questions, nous avons bénéficié d'un système expérimental de réhabilitation des sites dégradés par l'orpaillage mis en place par l'Office National des Forêts sur la Mine Boulanger.

Ce chapitre fait l'objet d'un article soumis à :

Soil microbial activity in a reforestation sequence after gold mining in French Guiana

Heidy Schimann, Jean Christophe Roggy, Bruno Buatois, Eric Marcon, Richard Joffre, Robert Lensi, and Anne-Marie Domenach

1. Abstract:

We used experimental plantations settled on a gold mine in French Guiana in order to evaluate the success of the rehabilitation and the impact of plantations on the recovery of soil functions. We described the functioning of the soil system through "actual" and potential activities (respiration and denitrification) and through the ratios between them. All our results have shown that dynamics of soil functioning reconstruction are accelerated by the plantation and this for any substratum. They also showed that the bioindicators we used integrate the impact of plantation and of the substratum at the same time; and also allowed (i) to define a site-specific stability threshold, and (ii) to express modifications of functioning and a return to an equilibrium state independently from the substratum.

Keywords: reforestation, soil functioning, denitrification, respiration, tropical forest, NIRS, biodescripteurs

2. Introduction:

Mining can generate significant damages to ecosystem processes (Jaffré & Rigault, 1991). In forests, the primary effects of mining are removal of aboveground biomass and the creation of extreme soils conditions (high surface compaction, low water holding capacity, and low mineral nutrient concentrations and high levels of toxic metals; (Ramakrishna & Narasimham, 1988; Sarrailh, 1990 ; Tsutui, 1991)). After these disturbances and without any human intervention, it has been established that little vegetation is able to grow on these soils except some grasses, and thus natural forest succession is effectively stalled (Bradshaw, 1997). Even if indigenous plant species occur, their growth is extremely low or inexistent due to inhibitory factors (Bradshaw, 1997). In most situations, particularly on mine waste sites, the process of natural succession could be slowed such that vegetation cover does not develop even within decades (Bradshaw, 1997). It is very difficult to predict the successional trajectories in anthropogenic settings. In fact, recovery of biophysical properties and of vegetation is tightly dependent of interactions between site factors and land-use of the area (Guariguata & Ostertag, 2001). In tropical forest, numerous restoration programs have been attempted to accelerate succession on degraded sites. Several studies have found that planting treatments for initial vegetative cover can help to stop erosion and facilitate seed dispersal and establishment of native forest species from outside the zone. Restoration programs generally involve the planting of species resistant to the severe climatic and soil conditions. Legumes are often used because they can fix atmospheric nitrogen and are thus not dependent on the depauperate nutrient reserves (Butterfield, 1996; Tilki & Fisher, 1998; Parrotta & Knowles,

2001). On mining areas, several woody legume species have been used in rehabilitation, including species of *Leucaena* (Hutton, 1982) or *Acacia mangium* (Hulugalle, 1992; Lugo, 1992; Bernhard-Reversat & Fahey, 1993). Even in highly degraded areas, these species have been found to maintain a high growth rate and to increase soil fertility. Moreover, studies showed that initial plantations of these species do not inhibit the subsequent establishment of local shade-tolerant species and may facilitate those dependent on soil nitrogen supplies (Parrotta, 1992; Lamb & Lawrence, 1993; Parrotta, 1993).

The success of rehabilitation depends on the restoration of soil fertility, which comprises a physico-chemical component and the recovery of biological functions (especially microbial ones). Indeed, (Loreau, 2001, Nannipieri, 2003 #36) showed that the efficiency of nutrient cycling effectuated by soil microbial communities could impact ecosystem functions such as productivity. The major part (up to 80-90 %) of the soil processes in the superficial soil layer (e.g., mineralization, immobilization, etc.) is performed by soil microflora (Nannipieri *et al.*, 2003, Torsvik, 2002 #37). Despite these observations, few studies have been conducted on the recovery of soil biological functions to evaluate the success of restoration programs. Thus, it is needed to take into account the microbial functions (associated with other characteristics) to define the “quality” of a soil, or to evaluate the evolution of the “quality” of a degraded soil. (Pankhurst *et al.*, 1997) showed that the use of plant community indicators such as plant species composition or biomass failed to assess accurately soil “quality”. (Carter *et al.*, 1997) and (Schloter *et al.*, 2003) evaluated soil quality by microbial biomass and respiration measurements, nitrogen mineralization, microbial diversity and functional groups of soil fauna. (Dighton, 1997) showed that direct measurements of soil microbial functions were also necessary. Assays of comparisons between disturbed and undisturbed site using ATP biomass, fungal ergosterol dehydrogenase activity (Bentham *et al.*, 1992), or combination of enzymes activities (Tscherko & Kandeler, 1999) succeeded and were more efficient than physico-chemical characteristics. Such approaches seemed to be powerful discriminant tools. Thus, it is very likely that using key microbial functions in soil would allow describing the success of reconstruction of soil functioning in reforestation designs.

Our objectives were to use experimental plantations settled on a gold mine and evaluate the success of the rehabilitation, via the recovery of soil functioning throughout microbial descriptors. Our approach was original in that we chose to describe the functioning of the soil system through (i) "actual" and potential activities (i.e. biocatalysed transformation controlled by enzymatic factors of limitation or inhibition *vs.* maximal capacity to realize a biotransformation) of two microbial functions (Maron *et al.*, 2003) and (ii) through the ratios between them. Potential activity, in contrast to "actual" activity, can be used as a tool to characterize the state of functioning of the entire soil system, because it does not respond to short-lived environmental changes (e.g., seasonal

precipitations) but rather to long-lasting or deeper changes (Nannipieri *et al.*, 2002). Ratios between two different functions or between a potential and an "actual" function allow to characterize modifications in soil functioning. We chose to study soil respiration and denitrification because they overlap the same metabolic process, a respiratory process that is expressed differently under different environmental conditions (aerobic for respiration, anaerobic for denitrification) (Tiedje, 1984b). These functions are performed by a diversity of abundant organisms and are thus adequate to represent the entire soil system (Cavigelli & Robertson, 2000). They present the advantage to be in different proportions in the soil: the denitrifying community represents 1 to 5 % of the heterotrophic community in a soil.

Our working hypotheses were (i) that dynamics of soil functioning reconstruction after mining activities (measured via microbial indicators) are accelerated by the plantation of legume species, (ii) that plantations compensate for the heterogeneity of the soil substratum generated by mining and thus (iii) that the response to plantation is consistent among several different indicators- including microbial potential and "actual" activities, NIRS and C:N data- and independent from soil substratum. In particular, we predicted that microbial indicators in sites restored via plantations of legumes will demonstrate levels of soil microbial functioning intermediate between unrestored areas and natural forest conditions.

3. Methods

3.1. Experimental site and sampling strategy:

The experimental zone situates on a gold mine, Mine Boulanger, which is located in the east of French Guiana, on the Coralie track (longitude 52°20 west, latitude 4°30 north). On this mine, the ONF (Forest National Office) has installed an experimental project of reforestation since 1996. The objectives were to limit soil erosion and to reconstitute the biotope so that the natural processes of plant succession start. The final objective is a return to a stage as close as possible of the primary forest.

The experimental design is constituted of several plots of six years old - *Acacia mangium*, a Papouasia/New Guinea Legume. This fast growing legume was chosen for its exceptional rusticity and because its broad crown could rapidly cover the soil.

We prospected the entire plantation design and effectuated some soils analysis. Our objective was to choose (i) two planted plots with the more extreme soil granulometry (P1 and P2), (ii) a negative control - a more than six years old degraded area without *A. mangium* where only some herbs and Cyperaceae developed and which we considered as a blocked situation (CYP) and (iii) a positive control- the secondary forest surrounding the mine which we considered as the objective of

reforestation (FS). We then reconstituted a sequence of reforestation constituted of CYP, P1, P2 and FS. *A. mangium* represented up to 95% of the total basal area on P1 and P2. The soil carbon and nitrogen contents and the soil granulometry of the different plots are listed in table 1. Clay contents were the lowest (9.1%) for P1 and the highest (44.9 %) for P2. The CYP plot exhibited the lowest N and C contents.

15 soil cores of 50 cm x 20 cm x 10 cm were harvested on each plot according to a grid sampling strategy. In order to have a similar scheme on all the planted plots; the sampling grid was systematically delimited by three *Acacia mangium* and centred on one *Acacia mangium*. On the laboratory, soils samples were sieved at 2 mm to remove roots, air-dried and stored at room temperature until analyses.

3.2. Soil characteristics:

3.2.1. Physical-chemical characteristics

Five soil samples by treatment were sent to analyse for physical-chemical characteristics (granulometry). Fifty soils samples were analyzed for %N and %C in a CHN soil analyzer.

3.2.2. NIRS (Near Infrared Reflectance Spectroscopy) measurements:

NIRS is a classical method used in agricultural and manufacturing industries concerned for example with evaluating and improving the nutritive value of feedstuffs for livestock (Foley *et al.*, 1998). Near infrared radiation (750-2500 nm) is absorbed mainly by C-H, N-H and O-H bonds, which are the primary constituents of organic compounds of plant and animal tissues or soil organic matter (Osborne *et al.*, 1993). This analytical technique is known for its rapidity, simplicity, accuracy and has proved to be useful in assessing several properties of litter or soil materials (Palmborg & Nordgren, 1996; Palmborg *et al.*, 1998; Chodak *et al.*, 2002). Soil samples were scanned with a NIRSystem 6500 spectrophotometer. Each sample was parked into a sample cell with a quartz glass cover, placed in the spectrophotometer and the reflected light was measured. The spectral range used was of 400-2500 nm, with 2-nm intervals. For each measurement, 32 scans were made to produce a mean spectrum with 1050 data points. A total of 135 soil samples were analyzed. Absorbance values (log1/reflectance) were used for the data transformation and statistical analysis.

3.3. Microbial activities:

3.3.1. Potential denitrifying activity of soil (Tiedje, 1984a; Lensi, 1985):

For each sample, 10 g of sieved and air-dried soil were placed in a 150 ml plasma-flask and sealed with rubber stoppers. In each flask, air was removed and replaced by 90% of helium and 10% of acetylene to inhibit the N₂O-reductase, with a vacuum-pump. A solution containing 100 µg of N-KNO₃, 1 mg of C-glucose and 1 mg of C-glutamic acid per g of soil was added, in sufficient quantities to ensure a saturation of the sample of 100 %. The flasks were incubated 4 h at 30°C, so that there was no *de novo* enzymatic synthesis or cellular growth. 200 µl of gas sample were analysed for N₂O on a gas chromatograph with an electron capture detector (VARIAN 3800-CP).

3.3.2. Potential respiratory activity of soil:

Potential respiration (or Substrate Induced Respiration, SIR) was measured with the method of Anderson and Domsch (1978). For each sample, 10 g of sieved and air-dried soil were placed in a 150 ml plasma-flask. A solution containing 2 mg of C-glucose per g of soil was added to ensure 80% of saturation. The flasks were incubated 5h at 28°C so that no *de novo* cellular growth was possible. 200µl of gas sample were taken after 5 h and analyzed for CO₂ with a gas chromatograph (microcatharometer).

3.3.3. Activity of denitrification and respiration in “actual” conditions:

The samples were incubated in the conditions previously described but with no additional C or N sources. Gas sample were analysed for N₂O and CO₂ with a gas chromatograph (microcatharometer).

3.3.4. Ratio:

Modifications of soil functioning among the different treatments were studied with two types of microbial activity ratios: (1) "actual"/potential activity ratio and (2) potential denitrification / potential respiration ratio.

3.4. Statistical analysis:

All statistical analyses were performed using STATISTICA (Kernel V6.0 StatSoft INC, USA). Data were ranked to avoid the assumptions of normality (Friedman, 1937), and differences between means were analysed with the unequal n HSD *Post Hoc* test of Tukey ($P < 0.05$) after a one-way ANOVA.

4. Results:

4.1. Microbial activities in the different treatments (table 2):

4.1.1. Respiratory activity:

Values of potential respiration were significantly different between treatments. They ranged from $1.40 \mu\text{g CO}_2\text{-C g}^{-1} \text{ dry soil h}^{-1}$ for the CYP plot to $6.14 \mu\text{g CO}_2\text{-C g}^{-1} \text{ dry soil h}^{-1}$ for P2 with $\text{CYP} < \text{P1} < \text{FS} < \text{P2}$. "Actual" respirations were lower than potential respirations on most plots (P1, P2 and FS). They varied from $1.40 \mu\text{g CO}_2\text{-C g}^{-1} \text{ dry soil h}^{-1}$ for the CYP plot to $3.48 \mu\text{g CO}_2\text{-C g}^{-1} \text{ dry soil h}^{-1}$ for P2. Two distinct clusters were observed: (1) CYP, P1 and FS; (2) P2.

4.1.2. Denitrifying activity:

The potential denitrification ranged from $0.035 \mu\text{g N}_2\text{O-N g}^{-1} \text{ dry soil h}^{-1}$ for the CYP plot to $0.401 \mu\text{g N}_2\text{O-N g}^{-1} \text{ dry soil h}^{-1}$ for P2. Two significantly different clusters were observed: (1) CYP, (2) P1, P2 and FS. The "actual" denitrification gathers plots into two clusters: the CYP and FS plots with extremely low values (under the threshold of detection) and the P1 and P2 plots with values lower than those of potential denitrification.

Results indicated that potential respiration and denitrification displayed consistent evolution among the different treatments. P1 and P2 showed levels intermediate between unrestored areas and natural forest conditions for both variables.

4.1.3. Microbial activities ratios (Figure 1):

4.1.3.1. Ratios between "actual" and potential activity:

Ratios were only calculated for the respiration because the "actual" denitrification was too low. Figure 1 A shows that the "actual"/potential respiration ratio was higher than 0.5 in all plots except for FS (ratio ~0.3). This ratio decreased along the sequence: The CYP and FS plots exhibited the highest and lowest values respectively and P1 and P2 intermediary values.

4.1.3.2. Ratios between potential denitrification and potential respiration:

The ratio increased along the sequence and showed significant differences between CYP and FS, P1 and P2, but not between CYP, P1 and P2 (fig. 1B). The values varied between 0.032 for CYP and 0.081 for FS, with intermediate values for P1 and P2 (0.043 and 0.064 respectively).

Table 1: Floristic composition and soil properties along a reforestation sequence. Values with the same letter(s) are not significantly different at $p < 0.05$ (unequal n HSD *Post Hoc* test of Tukey).

		CYP	P1	P2	FS
Description		Area of Cyperaceae, no human intervention	Plantation of <i>A.mangium</i>	Plantation of <i>A.mangium</i>	Area of secondary forest
Years in 2002		7	7	7	
Surface (ha)			0.17	0.7	
Plantation of <i>Acacia mangium</i>	Initial density		1250	1250	
	Recovery rate		>90%	>90%	
	Basal area		94%	96%	
Granulometry (%)	Clay	19.8 ^a ± 1.7	9.1 ^b ± 1.49	44.9 ^c ± 2.24	25.8 ^d ± 1.38
	Loam	16.2 ^a ± 0.99	18.9 ^a ± 5.42	19.7 ^a ± 1.52	5.7 ^b ± 0.63
	Sand	64 ^a ± 2.67	72 ^b ± 7.27	35.4 ^a ± 0.89	68.5 ^a ± 1.48
C and N contents	%N	0.024 ^a ± 0.007	0.118 ^b ± 0.039	0.232 ^c ± 0.05	0.182 ^c ± 0.012
	%C	0.324 ^a ± 0.083	1.81 ^b ± 0.51	3.352 ^c ± 0.72	2.671 ^c ± 0.2

Table 2: "Actual" and potential respiration and denitrification along a reforestation sequence (\pm standard error of mean). Values with the same letter(s) are not significantly different at $p < 0.05$ (unequal n HSD *Post Hoc* test of Tukey).

	CYP	P1	P2	FS
Potential respiration(μg $\text{CO}_2\text{-C g}^{-1}$ dry soil h^{-1})	1.403 ^a ± 0.04	3.779 ^b ± 0.27	6.138 ^c ± 0.39	4.699 ^d ± 0.20
"actual" respiration ($\mu\text{g CO}_2\text{-C g}^{-1}$ dry soil h^{-1})	1.401 ^a ± 0.015	1.926 ^{a,b} ± 0.15	3.484 ^c ± 0.21	1.460 ^b ± 0.08
Potential denitrification ($\mu\text{g N}_2\text{O-N g}^{-1}$ dry soil h^{-1})	0.035 ^a ± 0.06	0.167 ^b ± 0.025	0.401 ^c ± 0.04	0.377 ^c ± 0.037
"actual" denitrification ($\mu\text{g N}_2\text{O-N g}^{-1}$ dry soil h^{-1})	10^{-4} ^a ± $3 \cdot 10^{-5}$	0.215 ^b ± 0.12	0.493 ^b ± 0.20	$3 \cdot 10^{-5}$ ^c ± $9 \cdot 10^{-6}$

4.2. Analysis of soil samples by NIRS (figure 2):

NIRS spectra (near infrared reflectance spectroscopy) were compared using a principal component analysis performed on all the spectral data. The two first axes represented 90% of the variance. The results showed three clusters: (i) the CYP plot which was well separated from the others, (ii) the P2 and FS plots and (iii) the P1 plot with spectral signatures less closely grouped than for P2 and FS.

5. Discussion

An increase of the values between the negative control (CYP) and the other plots has been established for all the microbial activities and for the carbon and nitrogen content. These results show the important impact of the plantations on the recovery of the soil functions. (Groffman *et al.*, 2001) demonstrated a diminution of the soil microbial activities after a disturbance like land-use changes (transformations of forests in pasture for example). Our results show that this phenomenon is likely to be reversible in an ecological engineering context of rehabilitation. In the six years old planted plots (P1 and P2), microflora seems to have recovered a functioning close to the one noted in forest (FS), oppositely to the CYP plot, which is yet the oldest one. Moreover, NIRS analysis showed an important variability of the organic matter and allowed to clearly distinguish CYP soils from those of the others plots (P1, P2 and FS). This approach presents the advantage of bringing a qualitative interpretation besides the quantitative informations given by the C and N contents (Palmborg *et al.*, 1998; Chodak *et al.*, 2002). Results show much contrasted soils biochemical characteristics that the C/N ratio analysis couldn't detect (data not shown). The short variability observed of the C/N ratios (between 12 and 15) seemed yet to suggest a good mineralization in all the plots (Hodge *et al.*, 2000). All these results confirm our starting hypothesis that dynamics of soil functioning reconstruction after mining activities are accelerated by the plantation of legume species. Several works already showed the major ameliorating effects of trees on degraded soils: (1) increase of soil organic matter resulting of carbon fixation by photosynthesis et its transfer *via* litters and roots turn-over (Bradshaw, 1997); (2) increase of soil N content by Legume species (Parrotta, 1992; Tilki & Fisher, 1998; Parrotta & Knowles, 2001); (3) increase of N mineralization and microbial biomass by rhizospheric effect (Mao *et al.*, 1992); (4) modification of microclimate (air and soil temperature, soil humidity) (Fisher, 1995); and (5) pumping of nutrients at a bigger deepness by deeper roots (Fisher, 1990).

P2 plot shows "actual" and potential activity values, C and N contents higher than those of the control (FS) and P1. Observed differences have to be linked to the extreme variability of

Figure 1: "Actual"/potential respiration (A), and potential denitrification/potential respiration (B) along a reforestation sequence. Values with the same letter(s) are not significantly different at $p < 0.05$ (HSD *Post Hoc* test of Tukey).

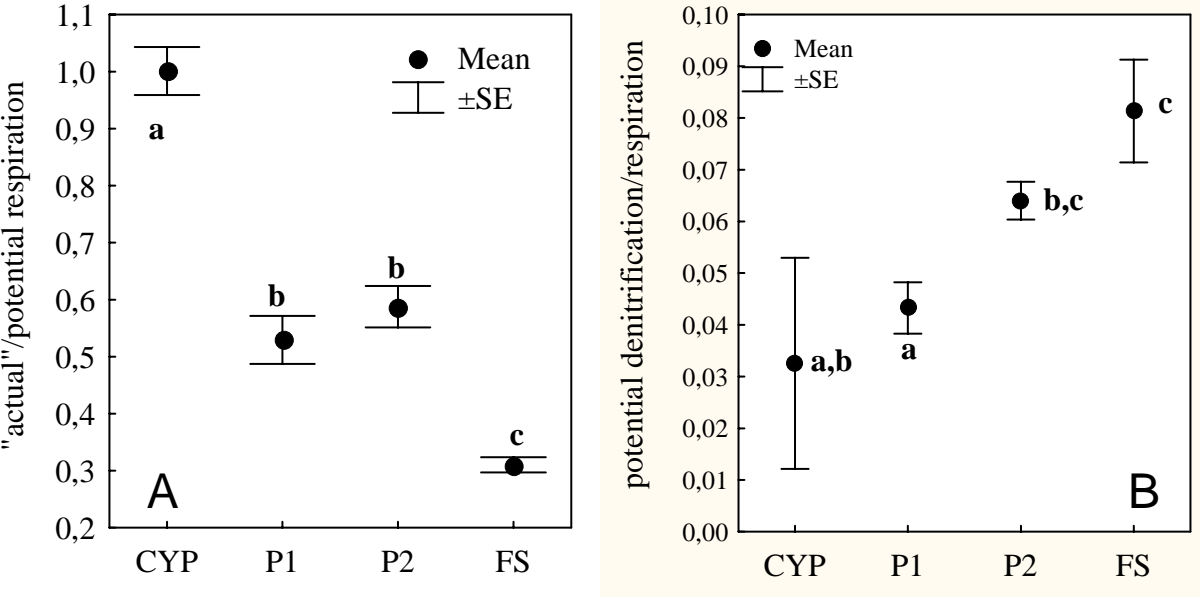
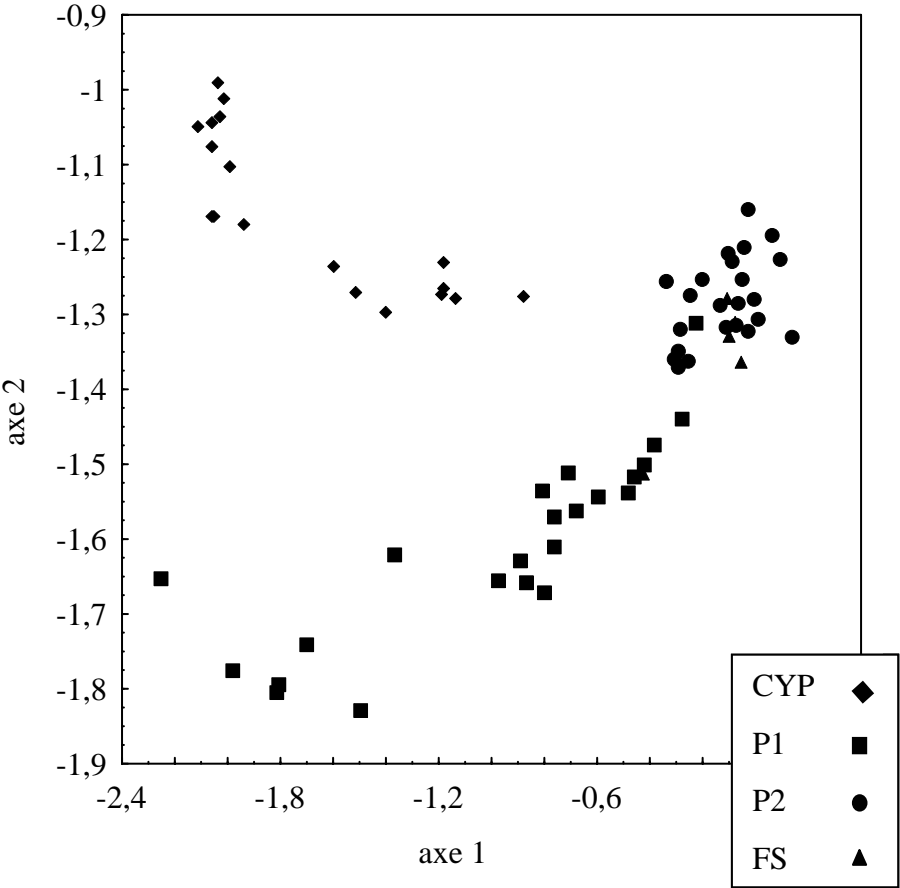


Figure 2: PCA of NIRS spectra of the soils along the sequence. Axis 1 and 2 absorb 90% of the variance



granulometry in soils. High clay contents (i) would increase (Müller & Höper, 2004) the trapping capacity of organic matter favouring then biological activity of heterotrophic communities and (ii) would favour as well the presence of anaerobic microsites favourable to denitrifying activity (Ranjard & Richaume, 2001). Potential activity measures are often considered as comparative measures of functioning (Nannipieri *et al.*, 2002), and only more complex variables such as ratios between two different functions or between an "actual" and a potential function are able to explain modifications of this functioning (Anderson, 2003). The ratio "actual"/potential respiration decreased significantly between treatments. The value close to 1 of the ratio in the CYP plot is linked to a low potential respiration comparatively to the other values which could be explained by a limiting density of organisms in soil and/or a limiting organic matter not allowing the presence of an active microflora. In the forest soil, in contrary, the low value of the ratio is linked to a low value of "actual" respiration comparatively to the others. The observations are in adequacy with (Schloter *et al.*, 2003) who showed that microorganisms generally present a limited growth and exploit very few of their capacities in non perturbed soils. (Anderson, 2003) proposed to use the C_{mic}/C_{org} ratio (microbial carbon/total soil carbon) as a site-specific baseline value for different soil systems which could be used as a stability indicator for quick recognition of an environmental change. The low value of the "actual"/potential ratio in the forest soil can also be considered as a stability indicator, site specific and characterizing its equilibrium state. Our results show that P1 and P2 plots present values of ratios intermediate between those of CYP and FS, independently from the substratum, and indicate that these soils are in the way of reconstruction and stabilization. Increase of the potential denitrification/respiration ratio along the sequence suggests an increase of the denitrifiers' proportion among the soil heterotrophic community. Disturbance linked to gold mining seemed to modify fundamentally the structure of the heterotrophic community, as showed by the significant difference of ratio between CYP and FS. Intermediate values of ratios of P1 and P2 suggest that plantations allowed the recovery of a community structure close to the forest one, and to accelerate this recovery independently from the substratum. This type of results have already been showed by (Gros *et al.*, 2004) after a study of microbial communities functioning in ski-run soils. For these authors, the perturbation caused by the construction of the run but also the restoration processes generated deep and long-lasting modifications of the soils microbial communities, in their structure and also in their activity.

Success of restoration is differently defined according to the authors. (Harris, 2003) distinguished two approaches: return to conditions close to the reference system or maximization of efficiency of the ecosystem with respect to its function; whereas (Bradshaw, 1997) made a distinction between the terms restoration (return to the original state), rehabilitation (partial return) and reclamation (ending up in some new state where either structure or function is different). All

these approaches integrate well in the ecological engineering concept as defined by (Charles & Kalaora 2003) which is intimately linked with the management and reparation notions. Considering the preponderant place of the soil in the functioning of ecosystems, it becomes essential to be able to correctly evaluate the soil system and its state *via* the definition of indicators of soil quality. (Arshad & Martin, 2002) suggested several indicators in agro-ecosystems: organic matter, top-soil depth, infiltration, aggregation, pH, electrical conductivity, suspected pollutants and soil respiration. However, all these indicators do not allow obtaining dynamic informations on the health state of soils, and on the way by which they respond to stresses and disturbances. In particular, measures based on soil microbial enzymatic activities are susceptible to respond to this demand: they can (i) reveal the diversity of present processes and then inform on biochemical potentials but also on a possible resilience of the system; (ii) inform on the soil quality as modifications of these activities can give informations on progress of the remediation. (Schloter *et al.*, 2003). Several authors have already proposed descriptors based on microbial communities properties and that teach on structure of the community (Glaser *et al.*, 2003) on its physiological capacities (Hofman & Dusek L., 2003), or on stabilization of the community (Anderson, 2003). The functional descriptors we used in this study totally integrate in this context. They reveal to be pertinent to characterize recovery of perturbed soil functions with help of tree plantation (respiration and denitrification) but also to evaluate the acceleration of reconstruction dynamic (NIRS analysis) and modifications of the functioning (ratios). They respond to the criteria defined by (Doran & Zeiss, 2000) for whom soil quality indicators should (1) well define ecosystemic processes, (2) integrate physical, chemical and biological properties, (3) be sensitive to management and climatic variations, (4) be accessible and useful for concerned public.

6. Conclusions

Our objectives were to evaluate the impact of plantations on the recovery of soil functions by using microbial functional indicators. For that, we chose to be in very contrasted substratum conditions, our hypothesis being that effect of plantations would largely predominate the substratum. All our results have shown that dynamics of soil functioning reconstruction are accelerated by the plantation and this for any substratum. They also showed that definition of bioindicators based on potential or "actual" activities integrate impact of plantation and of the substratum at the same time; whereas a ratio approach ("actual"/potential respiration or potential denitrification/respiration) allows (i) to define a site-specific stability threshold, characterized by the positive control, and (ii) to express modifications of functioning and a return to a equilibrium state independently from the substratum, which could confer to this approach a generic level. NIRS

method already prove its prediction capacity for C,N,P and S in soils.(Chodak *et al.*, 2002 ; Ludwig *et al.*, 2002 ; Coûteaux *et al.*, 2003), but also for biological markers characteristics (Palmborg & Nordgren, 1993, 1996; Palmborg *et al.*, 1998). Prediction of functional characteristics of complex systems such as soils can be one of the important applications of this analysis method.

7. Literature Cited

- Anderson T.-H. (2003) Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 98, 285-293
- Arshad M.A. & Martin S. (2002) Identifying critical limits for soil quality indicators in agro-ecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 88, 153-160
- Bentham H., Harris J.A., Birch P. & Short K.C. (1992) Habitat classification and soil restoration assessment using analysis of soil microbiological and physico-chemical characteristics. *Journal of Applied Ecology*, 29, 711-718
- Bernhard-Reversat & Fahey G.C. (1993) Dynamic of litter and organic matter at the interface in fast growing tree plantations non sandy ferrallitic soils (Congo). *Acta Oecologica*, 14, 179-195
- Bradshaw A. (1997) Restoration of mined lands - using natural processes. *Ecological Engineering*, 8, 255-269
- Butterfield R.P. (1996). Early species selection for tropical reforestation: a consideration of stability. *Forest Ecology and Management*, 81, 161-168
- Carter M.R., Gregorich E.G., Anderson E.W., Doran J.W., Janzen H.H. & Pierce F.J. (1997) Concepts of soil, quality and their significance. In: *Soil quality for crop production and ecosystem health* (eds. Gregorich EG & Carter MR), pp. 1-19. Elsevier, Amsterdam
- Cavigelli M.A. & Robertson G.P. (2000). The functional significance of denitrifier community composition in a terrestrial ecosystem. *Ecology*, 81, 1402-1414
- Charles L. & Kalaora B. (2003) L'ingénierie écologique entre écologie, technique et aménagement : des enjeux durables. In: *Pour une approche socio-écologique du champ de l'environnement* (eds. Lévêque C & Leeuw Svd), pp. 225-235
- Chodak M., Ludwig B., Khanna P. & Beese F. (2002) Use of near infrared spectroscopy to determine biological and chemical characteristics of organic layers under spruce and beech stands. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 165, 27-33
- Coûteaux M.-M., Berg B. & Rovira P. (2003). Near infrared reflectance spectroscopy for determination of organic matter fractions including microbial biomass in coniferous forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 1587-1600
- Dighton J., Pierce F (1997). Is it possible to develop microbial test systems to evaluate pollution effects on soil nutrient cycling. In: *Ecological Risk Assessment of Contaminants in Soil* (eds. van Straalen NM & Lokke H), pp. 51-69. Chapman and Hall, London
- Doran J.W. & Zeiss M.R. (2000) Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, 15, 3-11

Fisher R.F. (1990). Amelioration of soil by trees. In: *Sustained productivity of forest soils* (eds. Gessel SP, Lacate DS, Weetman GF & Powers RF), pp. 290-300. Faculty of Forestry, University of British Columbia, Vancouver

Fisher R.F. (1995) Amelioration of degraded rain forests soils by plantations of native trees. *Soil Science Society of America Journal*, 59, 544-549

Foley W.J., McIlwee A., Lawler I., Aragonés L., Woolnough A.P. & Berding N. (1998) Ecological applications of near infrared reflectance spectroscopy - a tool for rapid, cost-effective prediction of the composition of plant and animal tissues and aspects of animal performance. *Oecologia*, 116, 293-305

Glaser B., Turrion Maria-Belen & Alef Kassem (2003). Amino sugars and muramic acid-biomarkers for soil microbial community structure analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, in press

Groffman P.M., McDowell W.H., Myers J.C. & Merriam J.L. (2001) Soil microbial biomass and activity in tropical riparian forests. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 1339-1348

Gros R., Jocteur Monrozier Lucie, François B., Chotte J.-L. & Faivre Pierre (2004). Relationships between soil physical-chemical properties and microbial activity along a restoration chronosequence of alpine grasslands following ski run construction. *Applied Soil Ecology*, 27, 7-22

Guariguata M.R. & Ostertag R. (2001) Neotropical secondary forest succession: changes in structural and functional characteristics. *Forest Ecology and Management*, 148, 185-206

Harris J.A. (2003). Measurements of the soil microbial community for estimating the success of restoration. *European Journal of Soil Science*, 54, 801-808

Hodge A., Robinson D. & Fitter A. (2000). Are microorganisms more effective than plants at competing for nitrogen? *Trends in Plant Science*, 5, 304-308

Hofman J. & Dusek L. (2003). Biochemical analysis of soil organic matter and microbial biomass composition - a pilot study. *European Journal of Soil Biology*

Hulugalle N.R. (1992). Amelioration of highly degraded tropical alfisol by planting. I Changes in soil physical and chemical properties 1989-91. *Land degradation & Rehabilitation*, 3, 141-152

Hutton E.M.A. (1982). Selection and breeding of *Leucaena* for very acid soils. In: *Leucaena research in the Asian-Pacific region*, pp. 23-26. IRDC, Ottawa, Canada

Jaffré T., J. P. & Rigault F. (1991). Recherches sur les possibilités d'implantation végétales sur sites miniers. In: *rapport n°4*. Convention ORSTOM/SLN, Nouméa

Lamb D. & Lawrence P. (1993). Mixed plantations using high value rainforest trees in Australia. In: *Restoration of tropical forest ecosystems* (ed. Lieth H, Janzen H), pp. 101-108. Kluwer Academic Publishers

Lensi R., Gourbière F., Josserand A. (1985) Measurement of small amounts of nitrate in an acid soil by N₂O production. *Soil Biology and Biochemistry*, 17, 733-734

Loreau M. (2001) Microbial diversity, producer-decomposer interactions and ecosystem processes : a theoretical model. *Proceeding Research of Society of Biological Science*, 268, 303-309

Ludwig B., Khanna P.K., Bauhus J. & Hopmans P. (2002) Near infrared spectroscopy of forest soils to determine chemical and biological properties related to soil sustainability. *Forest Ecology and Management*, 171, 121-132

Lugo A.E. (1992) Tree plantations for rehabilitating damaged forest lands in tropics. In: *Ecosystems Rehabilitation, volume 2: Ecosystem analysis and synthesis* (ed. Wali MK), pp. 247-255. SPB Academic Publisher, The Hague, Netherlands

Mao D.M., Min Y.W., Yu L., Martens R. & Insam H. (1992) Affect of afforestation on microbial biomass and activity in soils of tropical China. *Soil Biology and Biochemistry*, 24, 865-872

Maron P.-A., Coeur C., Pink C., Clays-Josserand A., Lensi R., Richaume A. & Potier P. (2003) Use of polyclonal antibodies to detect and quantify the NOR protein of nitrite oxidizers in complex environments. *Journal of Microbiological Methods*, 53, 87-95

Nannipieri P., Ascher J, Ceccherini M T, Landig L, Pietramellara G & Renella G (2003) Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54, 655-670

Nannipieri P., Kandeler E.K. & Ruggiero P. (2002) Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: *Enzymes in the Environments* (eds. Burns RG & Dick R), pp. 1-33. Marcel Dekker, New York

Osborne B.G., Fearn T. & Hindle P.H. (1993) Pratical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis, Singapore.

Palmborg C. & Nordgren A. (1993) Modelling microbial activity and biomass in forest soil with substrate quality measured using near infrared reflectance spectroscopy. *Soil Biology and Biochemistry*, 25, 713-718

Palmborg C. & Nordgren A. (1996) Partitioning the variation of microbial measurements in forest soils into heavy metal and substrate quality dependent parts by use of near infrared spectroscopy and multivariate statistics. *Soil Biology and Biochemistry*, 28, 711-720

Palmborg C., Nordgren A. & Baath E. (1998) Multivariate modelling of soil microbial variables in forest soil contaminated by heavy metals using wet chemical analyses and pyrolysis GC/MS. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 345-357

Pankhurst C.E.K., Doube B.M. & Gupta V. (1997) Biological indicators of soil health : synthesis. In: *Biological indicators of soil health* (eds. Pankhurst CE, Doube BM & Gupta V), pp. 419-435. CAB International, Wallingford

Parrotta J.A. (1992a) The role of plantation forests in rehabilitating degraded tropical ecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 41, 115-133

Parrotta J.A. (1992b) The role of plantation forests in rehabilitating degraded tropical ecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 1, 115-133

Parrotta J.A. (1993) Secondary forest regeneration on degraded tropical lands. In: *Restoration of tropical forest ecosystems* (eds. Lieth H, Janzen H & Lohmann MA), pp. 63-73. Kluwer Academic Publishers

Parrotta J.A. & Knowles O.H. (2001) Restoring tropical forests on lands mined for bauxite: Examples from the Brazilian Amazon. *Ecological Engineering*, 17, 219-239

Ramakrishna R.S. & Narasimham R.L. (1988) Effects of soil compaction in sugarcane: part I on soil moisture, porosity and nitrification. *International Journal of Tropical Agriculture*, 6, 221-226

Ranjard L. & Richaume A. (2001) Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Research in Microbiology*, 152, 707-716

Sarrailh J.M. (1990) L'opération ECEREX. Etudes sur la mise en valeur de l'écosystème forestier guyanais. Après déboisement. Le point sur les recherches en cours. *Bois et Forêts des Tropiques*, 219, Spécial Guyane, 79-97

Schloter M., Dilly O. & Munch J. (2003) Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 98, 255-262

Tiedje J.M. (1984a) Denitrification. In: *Methods of soil analysis, part 2, chemical and microbiological properties, second edition* (ed. A L, Page, R.H. Miller, D.R.Keeney), pp. 1011-1026. American Society of Agronomy inc (ASA); Soil Science Society of America Inc (SSSA), Madison, 47

Tiedje J.M. (1984b) Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In: *Methods of soil analysis , part 2, Chemical and microbiological properties, second edition* (ed. A L, Page, R H Miller,D R Keeney), pp. 179-244. American Society of Agronomy Inc (ASA); Soil Science Society of America Inc (SSSA), 4

Tilki F. & Fisher R.F. (1998) Tropical leguminous species for acid soils : studies on plant form and growth in Costa Rica. *Forest Ecology and Management*, 108, 175-192

Tscherko D. & Kandeler E. (1999) Classification and monitoring of soil microbial biomass, N-mineralization and enzyme activities to indicate environmental changes. *Die Bodenkultur*, 50, 215-226

Tsutui H. (1991) Agricultural development and environmental conservation (Policy of FAO). *Irrigation Engineering and Rural Planning*, 21, 49-65

Chapitre 3 :

Impacts de perturbations sur le fonctionnement du sol

Dans ce chapitre, l'étude de l'impact de perturbations sur le fonctionnement du sol sera abordée *in vitro*. La encore, le système sol sera étudié en se focalisant sur ses communautés microbiennes et sur les éventuelles modifications qu'elle subissent lors de perturbations.

Nous avons choisi, afin de rester dans le contexte des perturbations consécutives à l'activité aurifère, d'étudier par le biais d'une expérience en microcosmes l'impact de deux types de perturbations : la présence de mercure et la chaleur. L'expérimentation en microcosmes présente l'avantage de pouvoir bénéficier de situations dans lesquelles il est possible de contrôler les conditions environnementales, la densité de microorganismes impliqués mais aussi l'intensité des perturbations. Cela permet d'aborder des questions d'écologie plus fondamentales, et il s'agissait ici d'examiner la relation perturbation-stabilité du sol. Plus précisément, nous avons utilisé le modèle microbien afin de comprendre l'impact de perturbations successives sur la vulnérabilité du sol. Préalablement, une analyse plus méthodologique a été menée afin de déterminer l'impact du type d'extraction d'ADN du sol sur leur diversité génétique. L'objectif était de mieux caractériser les biais introduits par la méthode d'extraction afin de s'assurer que la méthode choisie permette d'obtenir un pool d'ADN représentatif de l'ensemble de la communauté microbienne du sol.

1. Evaluation of quantitative and qualitative recovery of bacterial communities from different soil types by density gradient centrifugation

Ce paragraphe a fait l'objet d'un article de Pierre-Alain MARON, **Heidy SCHIMANN**, Lionel RANJARD, Elisabeth BROTHIER, Anne-Marie DOMENACH, Robert LENSI, et Sylvie NAZARET qui a été soumis à **Research in Microbiology**.

Key words: bacterial community, soil, density gradient, DNA fingerprint

1.1. Abstract

Extracting and purifying a representative fraction of bacteria from soil is necessary for the application of many techniques of microbial ecology. Here the influence of different soil types on the quantitative and qualitative recovery of bacteria by soil grinding and Nycodenz density gradient centrifugation was investigated. Three soils presenting contrasted physicochemical characteristics were used for this study. For each soil, the total (AODC : Acridine Orange Direct Count) and culturable (cfu : colony-forming units) bacterial densities were measured in three distinct fractions: (i) the primary soil, (ii) the soil pellet (soil remaining after centrifugation), and (iii) the extracted cells. The Automated–Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (A-RISA) was used to characterise the community structure directly from the DNA extracted from each fraction. The physicochemical characteristics of soils were found to influence both the efficiency of bacterial cell recovery and the representativeness of the extracted cells in term of community structure. The most representative extracted cells were obtained from the soil exhibiting the lowest efficiency of cell recovery. Our results demonstrated that quantitative and qualitative cell recovery using Nycodenz density gradient centrifugation are not related and could be differentially biased according to soil type.

Key words: bacterial community, soil, density gradient, DNA fingerprint

1.2. Introduction

Characterisation of bacterial communities from environmental samples can be performed by culture-independent methods relying on the extraction of specific macromolecules including nucleic acids, phospholipids, and proteins. Two procedures are classically used to extract such molecules. The first one involves the *in situ* lysis of cells (direct lysis) whereas the second one requires a preliminary step of isolation of microbial cells (cell extraction). Whereas direct lysis has been extensively used in the various protocols developed so far for DNA extraction [9,13,31], the cell extraction can be a prerequisite when the samples to be analysed contain high amounts of compounds (humic and fulvic acids, minerals,...) which can decrease yield and quality of the extracts. Furthermore, extraction of labile molecules such as mRNA or proteins might be strongly affected by procedures involving direct lysis.

Several cell extraction approaches have been applied for the treatment of soil samples. They typically involve a dispersion of the soil by blending, rotating or ultrasonic treatments [15-16] followed by a centrifugation step. Centrifugation can be either i) a low speed process in which separation is based on the difference of sedimentation rate between bacterial cells and soil particles [6,16], or ii) a high speed process allowing the separation on the basis of buoyant Nycodenz gradient density [16]. Separation of bacteria from soil particles by Nycodenz gradient centrifugation presents the advantage to be fast and to obtain a cellular fraction poorly contaminated with soil compounds [22]. Several studies aimed to evaluate the efficiency of this method on the yield of bacterial cell recovery and the physiological state of the extracted bacteria [4,15,17,19]. Bacterial cell recovery ranged from 5 % to 50 % of the whole soil bacteria without modification of the survival and metabolic activity of recovered cell [3-4,15,19]. The results obtained from these different studies were difficult to compare because of the different procedures of soil dispersion-Nycodenz gradient used. However, they provided evidence that the efficiency and biases of the high speed centrifugation approach were dependent of the soil type, the lower yields being generally observed with fine texture soil exhibiting important silt and clay contents [3,17,19].

Recently, Courtois *et al.* [4] optimised the Nycodenz buoyant density gradient cell extraction method developed by Lindahl and Bakken [16]. They determined a protocol ensuring a good dispersion of the soil aggregates into particles as well as a good separation of bacteria from soil and assessed whether the extracted cells were qualitatively representative of the whole indigenous community. This study evidenced no significant difference in the observed diversity of the extracted cells compared to the diversity of the bacteria directly lysed in the soil excepted for the γ -subclass of Proteobacteria. They concluded on the efficiency of the Nycodenz density gradient method to

isolate soil bacterial community for further robust characterisation. However, this work was restricted to the bacterial community of one soil type (silty clay, pH 7).

Here, a comprehensive study was conducted to evaluate the influence of soil type on the quantity and the quality of the cells recovered by this method. This was carried out by applying the Nycodenz density gradient extraction procedure on different soils chosen because of their contrasting physico-chemical and structural characteristics, and by comparing the cell density and the genetic structure of the bacterial communities associated to the primary soil sample, the extracted cells and the soil pellet (soil remaining after centrifugation). A single procedure for soil dispersion and cell extraction similar to that developed by Lindhal and Bakken [16] and further slightly modified by Courtois *et al.* [4] was used for all studied soils. Cell densities were determined by Acridine Orange Direct Count (AODC) and by enumeration of colony-forming units (cfu). The genetic variation of bacterial communities was estimated using a culture independent technique, the A-RISA (automated rRNA intergenic spacer analysis), which relies on the length polymorphism of the intergenic spacer between the small (16S) and large (23S) subunit rRNA genes in the rRNA operon. The A-RISA fingerprinting was used since it allows the rapid examination of the genetic diversity of complex bacterial communities and was demonstrated to be sensitive and relevant for evaluating modifications of bacterial community composition [7,26].

1.3. Materials and methods

1.3.1. Soils

The soils used in this study were chosen because of their contrasting physico-chemical and structural properties (Table 1). Two soils were from temperate ecosystems (southeast of France): one from a permanent pasture of perennial grasses at Montrond and one from a maize culture at La Côte Saint André (LCSA). The third one was taken from the equatorial forest (French Guiana, South America). All soils were collected from the upper layer (0 to 10 cm), sieved (mesh size, 2 mm) and stored at 4°C for no longer than four weeks before use. Soils were incubated at room temperature for 10 days before use to avoid artefact due to changes in temperature.

1.3.2. Extraction of bacteria from the soil matrix

To separate indigenous bacteria from soil, 10 g of each soil were dispersed in 50 ml sterile NaCl 0.8% (w:v) with a Waring Blender (Eberbach Corporation, New Hartford, USA) in a midi-container (volume 50-250 ml). The blender was run at maximum speed (22,000 rpm) for 1.5 min. Dislodged cells were then separated from soil particles using a high speed centrifugation procedure with a

Nycodenz (Abcys SA, Paris, France) [28] density gradient, as described by Courtois *et al.* [4]. For this, 25 ml soil suspension was layered on top of a 11.5 ml cushion of Nycodenz (0,8 g/ml) before being centrifuged at 10.000 x g for 40 min in a swing out rotor (rotor TST 28.38, Kontron) at 10°C. This centrifugation leads to the sedimentation of soil particles through the Nycodenz and thus to the separation of bacterial cells which remain and form a band between the Nycodenz and the NaCl. For each sample, this layer of bacterial cells was recovered with a pipette as described previously [15]. Bacterial suspensions were washed with sterile water as described by Lindahl and Olsen [17]. The sedimented cells were finally resuspended in 1 ml of a 0.8 % (w:v) sterile NaCl solution. This extraction procedure resulted in two fractions: the extracted cells and the soil pellet (soil remaining after centrifugation). Nycodenz density gradient was performed in triplicate from each soil type.

1.3.3. Bacterial counts

Microorganisms were separated from soil by blending soil samples (10 g dry weight) with 50 ml of a 0.8 % (w:v) sterile NaCl solution for 1.5 min in a Waring blender (Eberbach Corporation). After the high speed centrifugation step, soil pellet and extracted cells were homogenised in 10 ml and 1 ml of a 0.8 % (w:v) sterile NaCl, respectively. The primary soil, soil pellet and extracted cells were serially diluted 10-fold in sterile saline solution.

Fluorescence microscopy enumeration of the total bacterial cells was done by acridine orange direct count (AODC), as described by Hobbie *et al.* [11] with counting of 30 randomly selected areas per filter.

The number of colony-forming units (cfu) were determined on 10% tryptic soy agar (TSA) (BioMérieux SA, Marcy l'Etoile, France) supplemented with the antifungal compound cycloheximide (200 µg.ml⁻¹ final concentration) after 3 days of incubation at 28°C. Three plates were inoculated per dilution. Plates with between 30 and 300 colonies were counted. Data were expressed as the means of triplicate determinations and standard deviation of the means.

1.3.4. DNA extraction

DNA was extracted from 0.5 g of primary soil and soil pellet of each soil type using a soil DNA extraction kit (FastDNA SPIN kit, Q-BIOgene, Illkirch, France). DNA from extracted cells recovered from 4.5 g (dry weight) soil sample was also extracted using this kit. Purified DNA samples were resolved by electrophoresis in a 1% agarose gel, stained with ethidium bromide, exposed to UV (lambda=254 nm) and photographed with a camera (Biocapt, Vilber Lourmat, Marne la vallée, France). Dilutions of calf thymus DNA (BIO-RAD, Marne la Coquette, France) were included in each gel and a standard curve of DNA concentration (500, 250, 125, 62.5 and

31.25 ng) was used to estimate the final DNA concentration in the purified extracts [24]. DNA extraction was performed in triplicate from each fraction of each soil.

1.3.5. A-RISA fingerprinting of bacterial communities

The intergenic spacer region between the small (16S) and large (23S) subunit rRNA genes in the rRNA operon was amplified by PCR using primers S-D-Bact-1522-b-S-20 (small eubacterial ribosomal subunit; 5'-TGCGGCTGGATCCCCCTCCTT-3'), which was labelled at its 5' end with the fluorochrome 6-carboxyhexafluorescein (HEX; Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France), and L-D-Bact-132-a-A-18 (large eubacterial ribosomal subunit; 5'-CCGGGTTTCCCCATTCGG-3') [20]. In addition to the intergenic spacer, the amplicons contain also 20 bp corresponding to primer S-D-Bact-1522-b-S-20 and about 130 bp from the 23SrDNA sequence. PCR amplification was done as described by Ranjard *et al.* [26].

A-RISA fragments were resolved by using the MegaBACE sequencer (MegaBACE, Amersham-Pharmacia, Orsay, France), in which DNA is electrophoresed in a capillary tube after a denaturation step at 95°C for 1 min. Samples consisted of aliquots (1.5 - 3 µl) of PCR products along with 0.25 µl of a red fluorescent internal standard (ET-ROX 900, Amersham-Pharmacia) and 1.75 to 3.25 µl of ultra-pure water. The samples were run under denaturing conditions at 44°C, for 3.5h at 6,000 V. The data were analysed by the Genotype Profiler software program (Amersham-Pharmacia). The software converted fluorescence data into electropherograms; the peaks represented fragments of different sizes, and the heights of the peaks were the relative proportion of the fragments in the total product.

1.3.6. Statistical analysis

Significant differences ($p < 0.05$) in AODC and cfu bacterial numbers between soil samples were determined using Statview-SE with Student's t test.

Data obtained from the Genotype profiler software were converted into a table summarizing band presence (i.e., peak) and intensity (i.e., height or area of peak) using the PrepRISA program [26]. This software allowed us to choose the number of peaks (i.e., all detected populations versus most dominant populations), the profile resolution (between 1 and 10 bp), and the method of evaluating peak intensity (height or area). For a robust analysis one hundred bands were integrated for A-RISA profiles with a 1 bp of resolution [26]. Principal Component Analysis (PCA) on a A-RISA covariance matrix was performed on the data matrix (bacterial communities as rows and peaks as columns). This method provided an ordination of bacterial communities and of the encoded bands,

Table 1: Physico-chemical characteristics of the studied soils (LCSA, Montrond, Guiana).

	LCSA	Montrond	Guiana
Soil origin	Culture	Permanent pasture	Forest
Sand (%)	47.7	20.1	23.9
Silt(%)	35.3	38.5	5.7
Clay (%)	17.0	41.4	70.4
Organic matter (%)	2.0	6.7	8.1
WHC (g H ₂ O (100 g dw) ⁻¹)	25.8	40.0	45.0
pH (H ₂ O)	7.0	6.2	4.5

Table 2: Acridine Orange Direct Counts (AODC), colony forming units (cfu) counts, bacterial culturability and DNA yields in primary soil, soil pellet and extracted cells from Montrond, LCSA and Guiana soils.

	Primary soil	Soil pellet	Extracted cells	cell recovery (%) ^z
AODC cell.g⁻¹ soil (dw)^Φ				
Montrond	3.03 10 ⁹ (± 0.69) ^a	2.28 10 ⁹ (± 0.42) ^a	1.36 10 ⁸ (± 0.33) ^b	4.5
LCSA	7.95 10 ⁸ (± 0.92) ^a	5.60 10 ⁸ (± 0.89) ^a	7.30 10 ⁷ (± 3.9) ^b	9.1
Guiana	1.81 10 ⁹ (± 0.26) ^a	1.51 10 ⁹ (± 0.4) ^a	8.79 10 ⁶ (± 2.2) ^b	0.5
Cfu. g⁻¹ soil (dw)^Φ				
Montrond	5.55 10 ⁷ (± 1.3) ^a	3.36 10 ⁷ (± 0.29) ^a	1.24 10 ⁶ (± 0.9) ^b	2.2
LCSA	3.20 10 ⁷ (± 0.2) ^a	2.45 10 ⁷ (± 0.7) ^a	1.66 10 ⁶ (± 0.13) ^b	5.1
Guiana	2.30 10 ⁸ (± 0.18) ^a	1.50 10 ⁸ (± 0.8) ^a	9.00 10 ⁵ (± 0.53) ^b	0.4
Bacterial culturability^Φ				
Montrond	1.83	1.48	0.91	-
LCSA	4.03	4.38	2.27	-
Guiana	12.73	9.91	10.23	-
DNA yields (μg. g⁻¹ soil)^Φ				
Montrond	6.61±0.82 ^a	7.34 ^a ±0.56 ^a	1.18±0.10 ^b	-
LCSA	5.97±0.49 ^a	5.35 ^a ±1.16 ^a	0.31±0.10 ^b	-
Guiana	1.16±0.06 ^a	1.55 ^a ±0.11 ^a	b.d.l.	-

^Φ Data are means of triplicate ± standard deviation. ^z percent of cell recovery was calculated as follow: number of extracted cells/ number of cell in primary soil. b.d.l.: below detection level. Superscript letters indicate significant differences at p<0.05 for AODC, cfu and DNA values between primary soil, soil pellet and extracted cell fractions for each soil independently.

which were plotted in two dimensions based on the scores in the first two principal components. PCA was performed using the ADE-4 software [30].

1.4. Results and discussion

1.4.1. Influence of soil type on the quantitative recovery of bacterial cells

Results of AODC and cfu counts in the primary soil, the extracted cells and in the soil pellet of each of the three soils are reported in Table 2. When assessed by AODC, the bacterial density of the primary soils ranged from 7.95×10^8 (LCSA) to 3.03×10^9 (Montrond) cells.g⁻¹ dry soil, and when assessed by cfu enumeration the bacterial density ranged from 3.2×10^7 (LCSA) to 2.3×10^8 (Guiana) cfu.g⁻¹ dry soil. The number of total (AODC) and culturable (cfu) bacterial cells between the primary soil and the soil pellet of each of the three soils were not significantly different (Table 2). However, AODC and cfu counts were significantly different (students t-test, $p < 0.05$) between the primary soil and the extracted cells. The total number of extracted bacteria as percentage of bacteria in the primary soil varied from 0.5 to 9.1% for the Guiana and the LCSA soils, respectively, for the AODC counts, and from 0.4 to 5.1% for the cfu counts. These extraction efficiencies are in the range of the values obtained by Mayr *et al.* [19] and Courtois *et al.* [4], but lower than the 25-50% observed by Bakken and Lindahl [3]. As reported earlier, such discrepancies may be explained by methodological differences and/or soil characteristics [19]. We used a single soil dispersion-cell extraction procedure for the different soils which was similar to that developed by Courtois *et al.* [4], whereas previous studies optimised soil dispersion and Nycodenz density gradient to enhance cell recovery (up to 50%) [5,4]. Courtois *et al.* [4] previously reported a 10% extraction yield for the LCSA soil which is very close to the 9.1% obtained for the same soil in the present study. Regarding the physicochemical characteristics of the soils used (Table 1), lower cell recovery were observed for the Guiana and Montrond soils, exhibiting the higher clay and organic matter contents. Inversely, the higher sand content in LCSA could explain an easier cell extraction. Bakken and Lindahl [3] previously showed that the extraction efficiency was negatively correlated to the clay content and Mayr *et al.* [19] found the highest extraction efficiency for sandy soils and the least for the finer texture soils.

The culturability (cfu expressed as a percent of AODC, ratio cfu/AODC) was 1.83, 4.03 and 12.73% for Montrond, LCSA and Guiana primary soils, respectively (Table 2). Those values were in agreement with the data reported previously [21,31]. The higher proportion of culturable cells observed in the Guiana soil (12.73%) might be explained by a higher amount and availability of trophic sources for microorganisms, enabling them to grow more efficiently on rich culture media,

Figure 1: Exemple of A-RISA electrophoregrams obtained for bacterial communities of extracted cells (A), primary soil (B) and soil pellet (C) of Montrond.

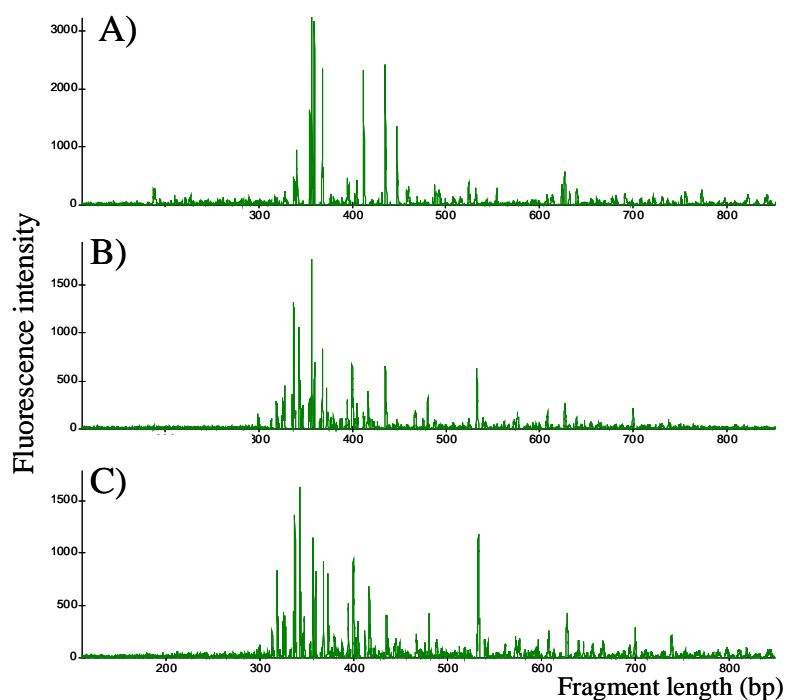
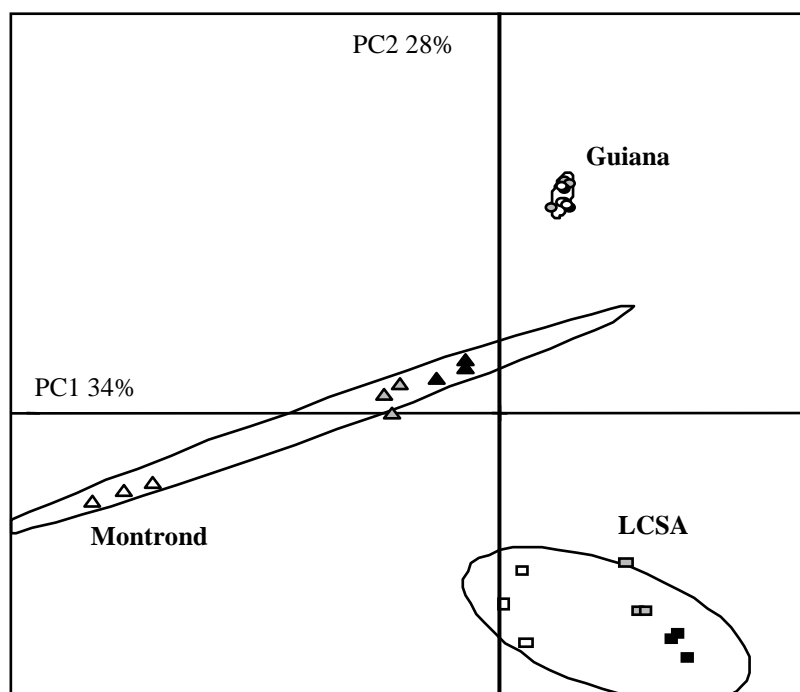


Figure 2: Principal component (PC1XPC2) plots generated from A-RISA independent triplicate profiles obtained from the different fractions: primary soil (black color), extracted cells (white color) and soil pellet (grey color) for each Montrond (triangles) LCSA (squares) and Guiana (cercles) soils. Ellipses represent 90% confidence limits.



because of the high organic matter content of this soil (Table 1) [12]. The culturability was slightly lowered by the Nycodenz density gradient extraction in all three soil types. This result was in agreement with the observations of Lindahl [15] but not with Mayr *et al.* [19] and Bakken [2] who reported similar or higher values of culturability in the extracted cells than in the primary soils. Bakken [2] hypothesised the increase of culturability to be due to the high purity of the extracted cells which allowed each cell to give a single colony whereas the primary soil contained cells aggregated to clay particles leading to a single colony for many clustered cells.

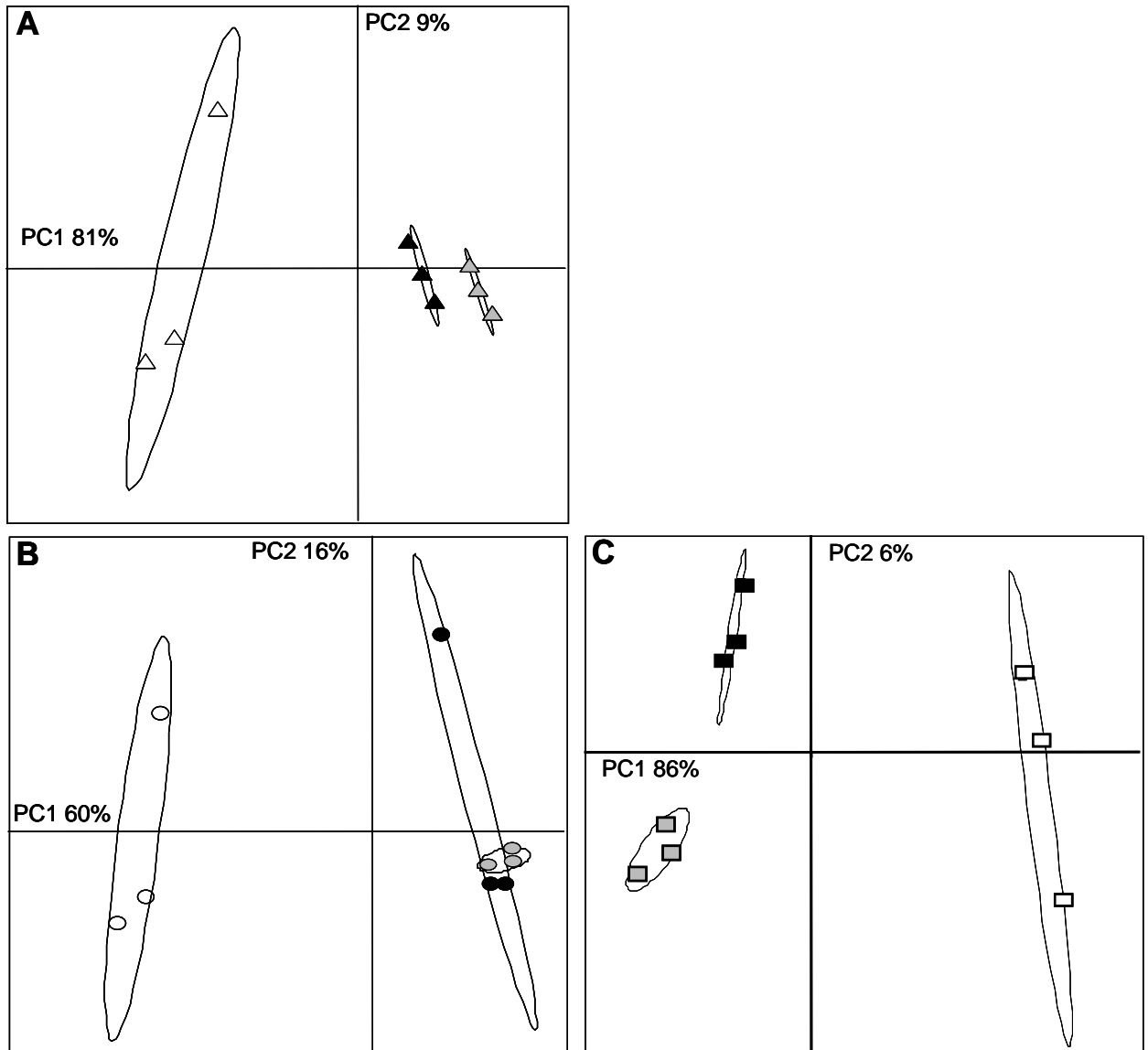
1.4.2. Influence of soil characteristics on the quantitative recovery of soil DNA

DNA was extracted from the primary soil, the soil pellet, and Nycodenz-recovered cells using a FastDNA Spin kit. The amounts of DNA recovered from the primary soil for the Guiana, LCSA and Montrond soils (Table 2) were in the range of those previously observed in soil environment [18,33]. Amounts of DNA recovered from the primary soils of Montrond and LCSA were significantly higher than from the Guiana soil (Students t-test, $p < 0.05$) despite comparable numbers of AODC counts. The lower amount of DNA recovered from Guiana soil might be explained by particular soil characteristics such as the high amount of clay minerals leading to a strong adsorption of DNA in the matrix [32]. When DNA yields were expressed per g of dry soil, lower values were obtained from the extracted cells fraction than for the primary soil for all soils tested (Table 2). A similar observation was made by Stefan *et al.* [29] and Courtois *et al.* [4]. Comparison of DNA yields from extracted cells between soils revealed highest value for Montrond soil and lowest one for Guiana soil, with a partial influence of cell number. As reported previously by Ranjard *et al.* [24], the theoretical expected yield of DNA in extracted cell fraction (AODC number in extracted cell fraction x theoretical amount of DNA per cell) were calculated by considering smallest (1.5 fg.cell⁻¹) and largest (9 fg.cell⁻¹) amount of genomic DNA per cell detected for indigenous soil bacteria. The results obtained (from 0.22 to 1.2, 0.12 to 0.65, 0.014 to 0.08 $\mu\text{g DNA.g}^{-1}$ soil for LCSA, Montrond and Guiana, respectively) were in the range of the amount of DNA extracted from cell fraction in each soil type (Table 2) and were consistent with the number of extracted cells as reported by Courtois *et al.* [4].

1.4.3. Influence of soil characteristics on the qualitative recovery of soil bacterial community

To determine, for each soil, whether the extracted cells were qualitatively representative of the indigenous bacterial community, the genetic structure of the extracted cells was compared to that of the primary soil and soil pellet. We used the same DNA extraction procedure to compare the

Figure 3: Principal component (PC1XPC2) plots generated from A-RISA independent triplicate profiles obtained from the different fractions: primary soil (black color), extracted cells (white color) and soil pellet (grey color) of Montrond (A), Guiana (B) and LCSA (C) soils. Ellipses represent 90% confidence limits.



genetic structure of bacterial community in each soil fraction (primary soil, soil pellet and extracted cells). Complex A-RISA patterns with bands ranging from 190 bp (i.e., 40 bp-IGS) to 1000 bp (850-bp IGS) were observed for the different fractions of each soil (Fig. 1). For all three soil types, the profiles obtained from extracted cells were visually different from the profiles obtained from the primary soils and the soil pellets whereas the primary soils and the soil pellets showed high similarity with each other (Fig. 1). Complexity of the A-RISA patterns (high number of bands with different intensities) from extracted cells suggested a substantial bacterial diversity, as also shown by Courtois et al. [4].

A principal component analysis (PCA) was performed on the A-RISA profiles to evaluate the similarity between the genetic diversity of the various fractions of the three soils. This method provided an ordination of the genetic diversity of bacterial communities, which were plotted in two dimensions based on the scores in the first two principal components [26]. Such an analysis discriminated the extracted cells from the other fractions of Montrond soil on the first axis (34% of the variance) and, to a lesser extent the extracted cells from the primary soil and soil pellet of LCSA (Fig. 2). The second axis, which explained 28% of the variance, clearly highlighted significant differences between the three soils. The three fractions of the Guiana soil grouped all together closely on this factorial map (Fig. 2). However, PCA performed independently on each soil, clearly confirmed the discrimination observed between the extracted cells and the primary soil and soil pellet for Montrond and LCSA soils. It also showed that the extracted cells of Guiana soil differed from the soil pellet and primary soil fractions (Fig. 3). The soil pellet differed from the primary soil in each case excepted for the Guiana soil. These analyses suggested that the extracted cells from the Guiana soil were the most representative of the primary soil. On the contrary, the extracted cells fraction of the Montrond soil were the least representative of the primary soil (Fig.2). Unexpectedly, the Guiana soil for which the efficiencies of cell and DNA recovery were the lowest provided the most representative cellular fraction of the whole soil community. In other terms, a good quantitative recovery of bacteria was not a robust indicator of the qualitative recovery of soil bacterial communities. These results could indicate a differential influence of the soil type on the density and the representativeness of the fraction of cells extracted by Nycodenz density gradient. The three soils were selected for their contrasting physico-chemical properties and differed widely in their composition of sand, silt and clay leading to different textural properties and structural organisation (Table 1) [23,25]. Ranjard and Richaume [27] reviewed that soil texture and structure influence the pattern of cell distribution at a microscale. Montrond soil was strongly aggregated with a pore volume well balanced between macro- and micropores [23] whereas Guiana soil exhibited a finer texture with predominantly clay organised in microaggregates drawing a network of micropores [5]. In this latter type of structure, a lower spatial heterogeneity of soil leads to a

more uniform cell distribution at a microscale [8,14]. This relative homogeneity of the Guiana soil could explain the observed good representativeness of the extracted cells fraction even if they represented only about 0.5% of the whole community.

Apart from abiotic characteristics, methodological biases and biotic characteristics such as a differential cellular lysis and DNA recovery between clean extracted cells and dirty primary soil as well as various innate diversity and physiological state of the microflora [1,10] might also contribute to the observed differences in the representativeness of the extracted cells fraction.

As a conclusion, our data pointed out the influence of soil type on the extraction efficiency as well as on the representativeness of the extracted cells in term of community structure. They underlined the need to adapt the procedure of extraction of soil bacterial cells by Nycodenz density gradient to each soil type according to their physical, chemical and biological properties. Different modifications of the Nycodenz extraction procedure can be proposed for a better extraction of bacteria and bacterial diversity from different soil types such as (i) the use of different dispersion media (use of pyrophosphate to optimise the chemical dispersion of cell [15]), (ii) the association of different physical dispersion treatments (blending, rotating, ultrasonic) prior to the high speed centrifugation step, or (iii) the repetition of the extraction step to increase the yield of bacteria recovered from a given soil sample. However, more drastic condition of extraction must preserve the cellular integrity to exclude Nycodenz medium to enter the cells, which would modify the density and the flotation of cells during Nycodenz density gradient centrifugation.

Acknowledgements.

This work was supported by a grant from the French "Ministère de la Recherche et de l'Education Supérieure". Thanks are also extended to G. Ganesh for supporting our work. This work is dedicated to the memory of F. Gourbière.

1.5. References

- [1] Å. Aakra, M. Hesselsøe, L.R. Bakken, Surface attachment of ammonia-oxidizing bacteria in soil, *Microb. Ecol.* 39 (2000) 222-235.
- [2] L.R. Bakken, , Separation and purification of bacteria from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (1985) 1482-1487.
- [3] L.R. Bakken, V. Lindhal, Recovery of bacterial cells from soil. In: J.D. van Elsas, J.T. Trevors (eds), *nucleic acids in the environment: methods and applications*, Springer Verlag, Heidelberg (1995) 9-27.
- [4] S. Courtois, A. Frostegård, G. Pernilla, G. Depret, P. Jeannin, P. Simonet, Quantification of bacterial subgroups in soil : comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. *Environ. Microbiol.* 3 (2001) 431-439.
- [5] A.R. Dexter, Advances in characterisation of soil structure. *Soil Till. Res.* 11 (1988) 199-238.
- [6] A. Faegri, V.L. Torsvik, J. Goksøyr, Bacterial and fungal activities in soil: separation of bacteria and fungi by a rapid fractionated centrifugation technique. *Soil Biol. Biochem.* 9 (1977) 105-112.
- [7] M.M. Fischer, E. Triplett, Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 4630-4636.
- [8] R.C. Foster, Microenvironments of soil microorganisms. *Biol. Fertil. Soils* 6 (1988) 189-203.
- [9] I.M. Head, J.R. Saunders, R.W. Pickup, Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb. Ecol.* 35 (1998) 1-21.
- [10] M. Hesselsøe, K.K. Brandt, J. Sorensen, Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in soil using microcolony technique combined with fluorescence *in situ* hybridization (MCFU-FISH). *FEMS Microbiol. Ecol.* 38 (2001) 87-95.
- [11] J.E. Hobbie, R.J. Daley, S. Jasper, Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33 (1977) 1225-1228.
- [12] S. Kanazawa, Z. Filip, Distribution of micro-organisms, total biomass, and enzyme activities in different particles of brown soil. *Microb. Ecol.* 12 (1986) 205-212.
- [13] A.D. Kent, E.W. Triplett, Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annu. Rev. Microbiol.* 56 (2002) 211-236.
- [14] G.N. Kilbertus, Etude des microhabitats contenus dans les agrégats du sol, leur relation avec la biomasse bactérienne et la taille des procaryotes présents. *Rev. Ecol. Biol. Sols* 17 (1980) 543-557.

- [15] V. Lindahl, Improved soil dispersion procedures for total bacterial counts, extraction of indigenous bacteria and cell survival. *J. Microbiol. Methods* 25 (1996) 279-286.
- [16] V. Lindahl, L.R. Bakken, Evaluation of methods for extraction of bacteria from soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 16 (1995) 135-142.
- [17] V. Lindahl, R.A. Olsen, Effects on microbial activity by extraction of indigenous cells from soil slurries. *FEMS Microbiol. Ecol.* 21 (1996) 221-230.
- [18] F. Martin-Laurent, L. Philippot, S. Hallet, R. Chaussod, J.C. Germon, G. Soulas, G. Catroux, DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 2354-2359.
- [19] C. Mayr, A. Winding, N.B. Hendriksen, Community level physiological profile of soil bacteria unaffected by extraction method. *J. Microbiol. Methods* 36 (1999) 29-33.
- [20] P. Normand, C. Ponsonnet, X. Nesme, M. Neyra, P. Simonet, ITS analysis of prokaryotes. In *Molecular Microbiology Ecological Manual*. Akkermans A.D.L., van Elsas J.D., and de Bruijn F.J. (eds). 3.4.5. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands. (1996) 1-12.
- [21] R.A. Olsen, L.R. Bakken, Viability of soil bacteria: optimization of plate-counting technique and comparison between total counts and plate counts within different size groups. *Microb. Ecol.*, 13 (1987) 59-74.
- [22] A. Priemé, I.B.J. Sitaula, A.K. Klemetsson, L.R. Bakken, Extraction of methane-oxidizing bacteria from soil particles. *FEMS Microbiol. Ecol.* 21 (1996) 59-68.
- [23] L. Ranjard, A. Richaume, L. Jocteur Monrozier, S. Nazaret, Response of soil bacteria to Hg(II) in relation to soil characteristics and cell location. *FEMS Microbiol. Ecol.* 24 (1997) 321-331.
- [24] L. Ranjard, F. Poly, J. Combrisson, A. Richaume, S. Nazaret, A single procedure to recover DNA from the surface or inside aggregates and in various size fractions of soil suitable for PCR-based assays of bacterial communities. *Europ. J. Soil Biol.* 34 (1998) 89-97.
- [25] L. Ranjard, E. Brothier, S. Nazaret, Sequencing bands of Ribosomal Intergenic Spacer Analysis fingerprints for characterization and microscale distribution of soil bacterial populations responding to mercury spiking. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 5334-5339.
- [26] L. Ranjard, F. Poly, J.C. Lata, C. Mougel, J. Thioulouse, S. Nazaret, Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 4479-4487.
- [27] L. Ranjard, A. Richaume, Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Res. Microbiol.* 152 (2001) 707-716.

- [28] D. Rickwood, T. Ford, J. Graham, Nycodenz: a new non-ionic iodinated gradient medium. *Anal. Biochem.* 123 (1982) 23-31.
- [29] R.J. Steffan, J. Goksøyr, A.K. Bej, R.M. Atlas, Recovery of DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (1988) 2908-2915.
- [30] J. Thioulouse, D. Chessel, S. Dolédec, J.M. Olivier, ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Stat. Comput.* 7 (1997) 75-83.
- [31] V. Torsvik, L. Øvreås, Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opinion Microbiol.* 5 (2002) 240-245.
- [32] J.T. Trevors, DNA in soil: adsorption, genetic transformation, molecular evolution and genetic microchip. *Antonie van Leeuwenhoek* 70 (1996) 1-10.
- [33] J. Zhou, M. Bruns, J. Tiedje, DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 316-322.

2. Impacts du mercure sur le fonctionnement microbien du sol et sa capacité à résister à une seconde perturbation :

2.1. Introduction:

Le sol constitue une composante majeure de la régulation des cycles biogéochimiques (Wardle & Giller, 1996). Il est donc essentiel de se rendre capable de prévoir l'impact de perturbations de type anthropiques sur son fonctionnement (Chapin III *et al.* ; Sala *et al.*, 2000 ; Houghton *et al.*, 2001; Grace, 2004). En effet, les inventaires montrent que la proportion de terres dégradées (érosion, cultures intensives, pâturages, déforestation, désertification, pollution, activités minières, etc..) ne cessent d'augmenter (Houghton *et al.*, 2001 ; Anderson, 2003) et s'accompagnent d'une perte de fertilité des sols susceptible de diminuer la productivité agricole mondiale (Doran & Zeiss, 2000 ; Arshad & Martin, 2002 ; Doran, 2002). Jusqu'à ces dernières années peu de travaux ont porté sur les relations entre structure et fonctionnement des communautés microbiennes du sol dans le cadre d'études sur les écosystèmes. Ceci peut s'expliquer (1) par le peu d'interactions existant entre microbiologistes et écologistes, et (2) par le manque de méthodes performantes d'analyse des communautés microbiennes du sol en raison de la complexité et des particularismes du monde microbien (Jessup *et al.*, 2004). La capacité à prévoir l'évolution biologique des sols passe donc par un effort de recherche accru sur la manière dont les perturbations peuvent affecter la structure et le fonctionnement des microorganismes.

Une des particularités des microorganismes est leur très grande diversité métabolique. Traduite en terme écosystémique, cela revient à dire que les microorganismes du sol sont capables d'exprimer un très grand nombre de fonctions (au sens bio-transformations). Il nous faudrait donc rendre compte des variations d'un ensemble multifonctionnel mais il n'est pas réaliste de penser que toutes les fonctions puissent être examinées. D'où la nécessité d'avoir recours à des fonctions bio indicatrices.

Sur un plan relevant davantage de l'écologie théorique, la grande diversité fonctionnelle mais aussi taxonomique des microorganismes du sol confère à ceux-ci un statut intéressant de modèle pour étudier la relation existant entre la biodiversité et le fonctionnement des écosystèmes (Wardle & Giller, 1996). En effet, la majorité des études sur cette relation ont été menées sur les végétaux (Tilman *et al.*, 1996 ; Grime 1997 ; Doran & Zeiss, 2000 ; Arshad & Martin, 2002 ; Doran, 2002) et très rarement sur les microorganismes du sol (Mikola & Setälä, 1998 ; Griffiths *et al.*, 2000a ; Griffiths *et al.*, 2000b ; Müller *et al.*, 2002).

L'objectif de ce travail s'intègre dans ce double contexte d'étude des perturbations et de celle de la relation biodiversité fonctionnement. En effet, il s'agit d'examiner l'impact du mercure sur le

fonctionnement microbien d'un sol de forêt tropicale humide de Guyane et sur son aptitude à résister à une seconde perturbation, la chaleur. L'évolution de la structure de la communauté microbienne a été également suivie afin (1) d'examiner l'impact de la perturbation mercurique sur la relation structure-fonction, et (2) d'émettre des hypothèses sur le rôle de la relation structure-fonction sur la capacité du sol à résister à la seconde perturbation. Plusieurs études ont déjà montré un impact fort des métaux lourds sur la diversité et sur le fonctionnement du sol (Baath *et al.*, 1998). Les sols de cette région sont fortement susceptibles d'être affectés par l'exploitation aurifère, donc d'être contaminés par le mercure. La deuxième perturbation par la chaleur est réaliste dans le contexte de la déforestation due à ce type d'activité.

Les modifications de fonctionnement du sol et, en particulier sa vulnérabilité aux perturbations (*i.e* la capacité d'une fonction à être atteinte, (Francaviglia *et al.*, 2004)), ont été évaluées à travers deux fonctions potentielles, la respiration et la dénitrification. Ces deux activités microbiennes correspondent raisonnablement bien aux critères devant présider au choix d'un bioindicateur microbien : (1) l'importance écologique des flux générés, (2) l'accessibilité technique à la mesure des activités choisies (Maron *et al.*, 2003) et, (3) la représentativité par rapport à l'ensemble de la communauté microbienne du sol. En effet, ces deux communautés, aérobie (respiration) et aérobie-anaérobie facultative (dénitrification) sont hétérotrophes, très diversifiées et très abondantes (Lensi, 1986), les dénitrifiants représentant à eux seuls 2 à 5 % de la microflore hétérotrophe globale (Tiedje, 1984b; Firestone & Davidson, 1989).

2.2. Matériel et méthodes:

L'ensemble de ce travail a été effectué en microcosmes en conditions contrôlées. Afin d'intégrer l'effet de la densité des microorganismes sur l'intensité de la réponse des fonctions, le nombre de microorganismes a été également suivi.

2.2.1. Caractéristiques du sol utilisé, préparation des microcosmes et plan expérimental

Le sol utilisé provient de la couche supérieure (10 premiers cm) d'une forêt secondaire dans la zone forestière ONF de Coralie-Est en Guyane française (52°20 de longitude ouest, 4°30 de latitude nord). Les caractéristiques physico-chimiques du sol sont résumées dans le tableau 1. Après prélèvement, le sol a été séché à l'air et tamisé à 2 mm puis une partie du sol a été stérilisée aux rayons-gamma (25 kgy – Ionisos – Dagneux, France). Après exposition aux rayons, un contrôle de stérilité a été effectué par étalement de suspensions de sol sur boîtes de Pétri contenant un milieu riche gélosé.

Le sol a été ensuite réparti dans 90 microcosmes à raison de 100g de sol sec par microcosme (84 microcosmes de sol stérilisé et 6 microcosmes de sol non stérilisé) posés sur une surface saturée en eau (feutrine). Ce système a permis de maintenir la teneur en eau des échantillons de sol à une valeur équivalente à la capacité au champ (CAPAC). Les microcosmes étaient constitués de tubes en PVC (10 cm de diamètre, 5 cm de hauteur) avec sur la face inférieure une grille de maille 1mm permettant la réhumectation du sol par capillarité.

Le dispositif expérimental décrit sur les figures 2 et 3 a été installé dans une serre à hygrométrie et température constantes (80% et 25°C respectivement). Trois microcosmes de chaque traitement ont été prélevés de manière aléatoire aux temps 0, 3, 6, 15, 30, 45 et 60 jours. Trois microcosmes témoins ont été prélevés aux temps 0 et 60 jours. Après prélèvement, le sol de chaque microcosme a été soigneusement homogénéisé. Une fraction a été utilisée immédiatement pour les dénombrements microbiens, une autre fraction a été stockée immédiatement à -20°C en vue de l'analyse de la diversité microbienne. Enfin, une troisième fraction a été séchée à l'air en vue de la mesure des activités potentielles microbiennes.

2.2.2. Application des perturbations

20 jours avant le T=0 de l'expérience (mise en place des microcosmes), du sol sec non stérilisé a été divisé en 6 lots de 1,3 kg. Trois lots ont été réhumectés avec de l'eau distillée et 3 lots par une solution de chlorure mercurique (HgCl_2 , 30 ppm), à raison de 400 ml.kg⁻¹ de sol sec. Les six lots de sol ont été ensuite régulièrement réhumectés et homogénéisés pendant 19 jours. Afin de travailler selon un schéma de perturbations successives mais non associées nous avons voulu éliminer l'interaction directe microorganismes–mercure à l'aide du protocole suivant : les microorganismes de la totalité de chaque lot de sol ont été extraits par traitements successifs d'aliquotes de 75g de sol. Chaque aliquote a été traitée avec 170 ml d'une solution de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ à 1% afin de favoriser la désorption des microorganismes, puis placée sous agitation pendant 20 minutes et traitée 3 fois une minute au Waring Blender (Eberbach Corporation, New Hartford, USA). Les suspensions ont ensuite été décantées 5 minutes dans des béchers. Les surnageants ont été prélevés puis centrifugés pendant 15 minutes à 7500 g. Les culots contenant les microorganismes ont été repris dans de l'eau physiologique (0,8% NaCl) puis rassemblés dans 6 Erlenmeyers correspondant aux 6 lots initiaux. Les suspensions microbiennes ont été ensuite placées à 4°C jusqu'à inoculation. Pour cela, le contenu de chaque Erlenmeyer a été centrifugé 30 minutes à 4700g puis les culots ont été repris dans 500 ml d'eau distillée. C'est cette dernière suspension qui a servi d'inoculum (schéma récapitulatif : figure 2).

Une seconde perturbation par la chaleur a été appliquée en plaçant les microcosmes pendant 15 heures à 60°C.

2.2.3. Dénombrement des microorganismes du sol par Acridine Orange (A.O.):

Le dénombrement des microorganismes a été effectué en utilisant le protocole de (Kepner & Pratt, 1994) modifié. 1g de sol frais a été mis en suspension dans 10 ml d'une solution de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ à 1% pendant 30 min. Ensuite, des dilutions sérielles (au $1/10^{\text{ème}}$) ont été réalisées. 5 ml d'une dilution permettant un comptage optimal ont été prélevés et traités avec 200 μl d'une solution d'acridine orange à 0,1% pendant 2 min. Cette solution a été filtrée à travers une membrane en polycarbonate d'un calibre de 0,2 μm (millipore). Après rinçage et fixation à l'isopropanol, la membrane a été montée entre lame et lamelle pour observation à l'aide d'un microscope à épifluorescence (lampe à UV). Le nombre de bactéries a été calculé à partir de la moyenne obtenue sur 20 champs choisis aléatoirement. La densité bactérienne (en cells.g^{-1} dw) dans chaque microcosme a été calculée suivant la formule :

$$X (\text{ nbre de bactéries.g}^{-1}\text{de sol}) = \frac{(n \times S_m)}{S_c} \times \text{facteur de dilution}$$

où

n = nombre moyen de cellules pour 20 champs

S_m = surface de la membrane = 1075,2 mm^2

S_c = surface d'un champ = 0.0177 mm^2

2.2.4. Mesure de la respiration potentielle :

La respiration potentielle (ou Substrate Induced Respiration, SIR) a été mesurée selon une technique modifiée à partir du protocole proposé par Anderson and Domsch (1978). 10g de sol sec ont donc été placés dans des flacons à plasma de 150 ml. Les flacons ont ensuite été fermés de manière hermétique par un bouchon en caoutchouc. A l'aide d'une seringue, 6 ml d'une solution de glucose (2mg C-Glucose.g⁻¹ de sol sec) ont été ajoutés pour se placer en concentrations non limitantes en donneurs d'électrons et 6 ml de l'atmosphère des flacons ont été retirés pour rétablir la pression atmosphérique. Ensuite, les flacons ont été incubés dans une étuve à 25°C pendant 4h puis la concentration en CO_2 a été mesurée grâce à un chromatographe en phase gazeuse équipé d'un détecteur à microcatharométrie (VARIAN CP-4900). L'appareil a été régulièrement étalonné avec des échantillons de CO_2 de concentrations connues. La relation entre les surfaces des pics obtenus et les concentrations connues de CO_2 injectées ont permis d'établir une droite étalon servant au calcul de la concentration en CO_2 correspondant au pic obtenu pour chaque échantillon analysé. Les résultats des potentiels de respiration sont exprimés en μg de C- CO_2 par gramme de sol sec et par heure ($\mu\text{g C-CO}_2.\text{g}^{-1}\text{sol sec.h}^{-1}$).

2.2.5. Mesure de la dénitrification potentielle

La mesure de la dénitrification potentielle (ou Denitrifying Enzyme Activity, DEA) a été effectuée selon le protocole modifié de Lensi (1985) et de Tiedje (1984a). 10g de sol sec ont donc été placés dans des flacons à plasma de 150 ml hermétiquement fermés avec des bouchons en caoutchouc. La phase gazeuse de chaque flacon a été remplacée par un mélange hélium/acétylène (90/10). Le remplacement de l'atmosphère initiale par l'hélium permet d'assurer l'anaérobiose et la présence d'acétylène (gaz ayant la propriété d'inhiber spécifiquement la N₂O-réductase – (Yoshinari, 1976)) permet d'assurer une transformation stoechiométrique de NO₃⁻ en N₂O. 8 ml d'une solution de glucose (1mg C-Glucose.g⁻¹ de sol sec), d'acide glutamique (1mg C-acide glutamique.g⁻¹ de sol sec) et de nitrate de potassium (200µg N-KNO₃ g⁻¹ de sol sec) ont ensuite été ajoutés dans chaque flacon et le même volume d'atmosphère des flacons a été extrait pour maintenir la pression à 1 atmosphère. Ensuite, les flacons ont été incubés dans une étuve à 25°C pendant 4 heures et la concentration en N₂O de chaque échantillon a été mesurée par chromatographie en phase gazeuse à détection par capture d'électron (VARIAN, CP 3800). Le chromatographe a été étalonné en injectant des gaz étalons contenant des concentrations connues en N₂O. Les résultats des potentiels de dénitrification sont exprimés en ng N-N₂O par gramme de sol sec et par heure (ng N-N₂O.g⁻¹ sol sec.h⁻¹).

2.2.6. Extraction d'ADN des sols et ARISA:

L'extraction de l'ADN a été effectuée selon le protocole de Ranjard *et al.* (2001) modifié. 4g de sol ont été suspendus dans 8 ml d'une solution de prétraitement (Tris HCl, 10 mM ; EDTA, 1 mM ; (Na₄P₂O₇), 0,1%). Après 30 min sous agitation à 25°C, le mélange a été centrifugé 10 min à 6000 rpm. Les culots ont été repris avec 3 ml de tampon TES (100 mM Tris - HCl [pH8], 100 mM EDTA [pH8], 100 mM Na₂HPO₄ [pH8], 1.5 M NaCl, 2 % SDS). 20µl de protéinase K (20 mg.ml⁻¹) ont été ajoutés, puis les échantillons ont été incubés pendant 2h à 37°C sous agitation. Après centrifugation pendant 10 min à 6500 rpm, les surnageants ont été collectés et les culots traités une seconde fois avec 1 ml de tampon TES. Après 15 min d'incubation à 37°C et centrifugation à 6500 rpm pendant 10 min, les surnageants ont été récupérés, ajoutés aux surnageants déjà recueillis, et placés 10 min à 70°C. Après ajout d'un volume de chloroforme/alcool isoamylique (24 /1), l'ADN a été séparé par centrifugation à 15000 rpm pendant 15 min à 15°C puis précipité avec de l'isopropanol froid et centrifugé à 15000 rpm pendant 30 min. Après lavage à l'éthanol 70%, les culots ont été séchés, repris dans 100µl d'eau ultra-pure puis congelés à -20°C.

L'analyse ARISA a été effectuée selon les protocoles de Ranjard *et al.* (2001). Après purification des ADN totaux (colonne Qiagen), une amplification des régions intergéniques des ADN

ribosomaux (intergènes 16S-23S) a été effectuée en utilisant les amorces marquées HEX 38L-D (grande sous-unité ribosomique ; 5'-CCG-GGT-TTC-CCC-ATT-CGG-3') et 72S-D (petite sous-unité ribosomique ; 5'-TGC-GGC-TGG-ATC-CCC-TCC-TT-3'). Après amplification, les produits de la PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'acrylamide à 6%, pendant 12 heures à 1500 V sur un ABI 313. Les données ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel GeneScan 3.1 (Perkin-Elmer). La concentration des produits PCR marqués a été estimée, et entre 1 et 3 µl de produits plus 0,5 µl de standard de taille interne (GeneScan 1000 bp ROX, Perkin-Elmer) ont été ajoutés à du formamide désionisé. Le mélange a été dénaturé à 95°C pendant 5 minutes. Le logiciel a permis la conversion des données de fluorescence en électrophorégrammes ; les pics représentant les fragments de différentes tailles et les hauteurs des pics représentant la proportion relative des fragments par rapport au produit total. Les longueurs (en paires de bases) ont été calculées à l'aide du standard de taille interne avec GeneScan. Une analyse en composante principale a été effectuée, qui requiert de coder les profils sur la base de la présence ou l'absence de bandes et de leur intensité, afin d'évaluer les similarités entre les communautés. Après utilisation du programme PrepRISA permettant d'obtenir rapidement résumant la présence de bandes (le pic) et l'intensité (hauteur ou aire du pic), une analyse en composante principale (à l'aide du logiciel ADE-4) sur la matrice de covariance a été réalisée sur la matrice de données (communautés bactériennes en lignes et les bandes en colonnes). Cette méthode permet l'ordination des communautés bactériennes et des bandes codées, plottées ensuite en 2 dimensions sur la base des résultats de l'ACP.

2.2.7. Teneur en mercure des sols :

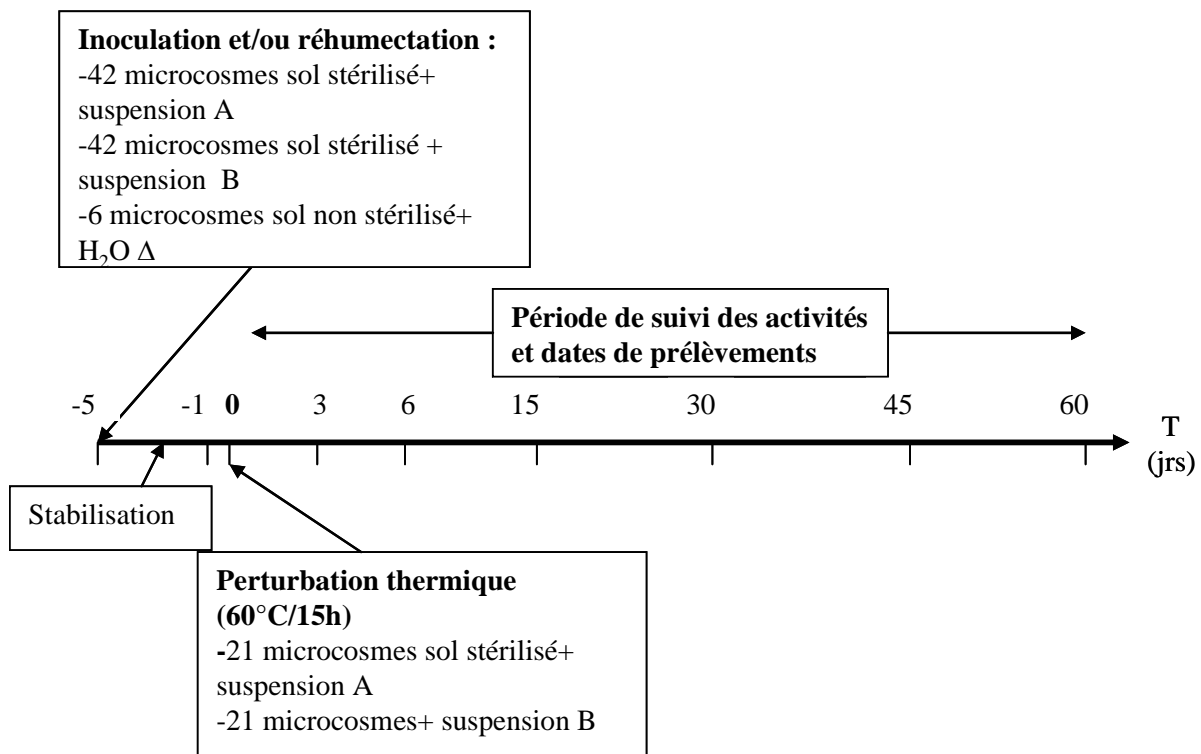
Des aliquotes de sol séché de chaque microcosme ont été envoyés pour analyse afin d'en déterminer la teneur en mercure. Les résultats sont présentés dans le tableau 2. Ils montrent que manifestement le protocole d'extraction des bactéries utilisé pour supprimer l'effet de rémanence du mercure n'a pas été efficace. En effet, les deux modalités ayant été perturbées par le mercure, en contiennent 15.57 et 23.30 ppm en moyenne à t=0 ("mercury" et "mercury + heat" respectivement) ; et à t=60, il y a 17.60 et 20.13 ppm respectivement. Par ailleurs les deux autres modalités ("control" et "heat") contiennent 1.49 et 1.70 ppm à t =0 ; et 1.26 et 1.75 ppm à t=60 respectivement, et sont significativement inférieures aux deux premières.

Cette démarche présentait l'avantage de réinoculer les microcosmes de sol stérilisé avec 2 consortia différents mais constitués de microorganismes indigènes du sol parental. L'extraction des bactéries du sol avait pour objectif de supprimer l'effet rémanent de l'ajout de mercure afin de pouvoir évaluer l'impact de perturbations successives sur le fonctionnement du sol. Ces résultats modifient les hypothèses que nous avons formulé dans le sens que nous ne regardons plus l'impact de

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques du sol de forêt tropicale humide utilisé

clay %	loam %	sand %	Organic matter %	pH H ₂ O	CEC cmol ⁺ .kg ⁻¹	N mg.g ⁻¹	C mg.g ⁻¹	C:N
24	8	68	4.1	4.9	6.6	0.042	0.61	14.66

Figure 1: Schéma résumant le plan expérimental



perturbations successives sur le fonctionnement des sols mais plutôt celui de perturbations associées.

2.2.8. Analyses statistiques:

Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel Statistica 6.0 (Statsoft Inc.). Les densités bactériennes ont été comparées pour toutes les dates de prélèvements et pour les 4 modalités à l'aide d'une analyse de variance (one-way ANOVA) avec la modalité comme facteur de catégorie. Les différences entre modalités à une date donnée ont été testées à l'aide du test post-hoc de Tukey à $p < 0.05$. Les effets du mercure, de la chaleur, puis des deux perturbations sur les fonctions microbiennes ont été analysés à l'aide d'une analyse de variance (one-way ANOVA) avec la présence de mercure, la présence de chaleur ou la présence de mercure et de chaleur comme facteurs catégoriels ; et ceci pour 4 dates de prélèvements ($t=0$, $t=15$, $t=30$ et $t=60$).

2.3. Résultats:

2.3.1. Evolution de la densité des microorganismes (AODC):

La densité bactérienne (nb bactéries.g⁻¹ sol sec ; figure 3) montre que les étapes d'extraction et de réinoculation n'ont pas eu de conséquences en ce qui concerne la densité initiale de microorganismes: elle est du même ordre de grandeur dans les microcosmes témoins réinoculés ("control") que dans les microcosmes de sol non réinoculés ("original soil") : $2.87 \cdot 10^8$ cells.g⁻¹dw et $2.40 \cdot 10^8$ cells.g⁻¹dw respectivement. Les densités de microorganismes à $T=0$ dans les 4 modalités ne sont pas significativement différentes (ANOVA, test de Tukey, $p < 0.05$) et varient entre $1.89 \cdot 10^8$ cells.g⁻¹dw et $3.34 \cdot 10^8$ cells.g⁻¹dw pour les modalités "heat" et "mercury" respectivement. Au cours de l'incubation les populations de microorganismes augmentent de manière parallèle dans les 4 modalités pour se stabiliser après 15 jours et atteindre une valeur proche de celle du sol témoin. Au bout de 60 jours, il n'y a pas de différences significatives de densité dans les microcosmes (ANOVA, post-hoc test of Tukey, $p < 0.05$) et les densités varient entre $2.79 \cdot 10^9$ cells.g⁻¹dw et $4.05 \cdot 10^9$ cells.g⁻¹dw pour les modalités "mercury + heat" et "mercury" respectivement. Etant donné que la densité en microorganismes semble atteindre un plateau à partir de 15 jours, nous avons considéré que cela reflétait une stabilisation des communautés microbiennes du sol. Nous avons par la suite limité les analyses fonctionnelles aux 4 derniers temps de prélèvement (15, 30, 45 et 60 jours).

Figure 2: Obtention des deux suspensions bactériennes et préparation des microcosmes

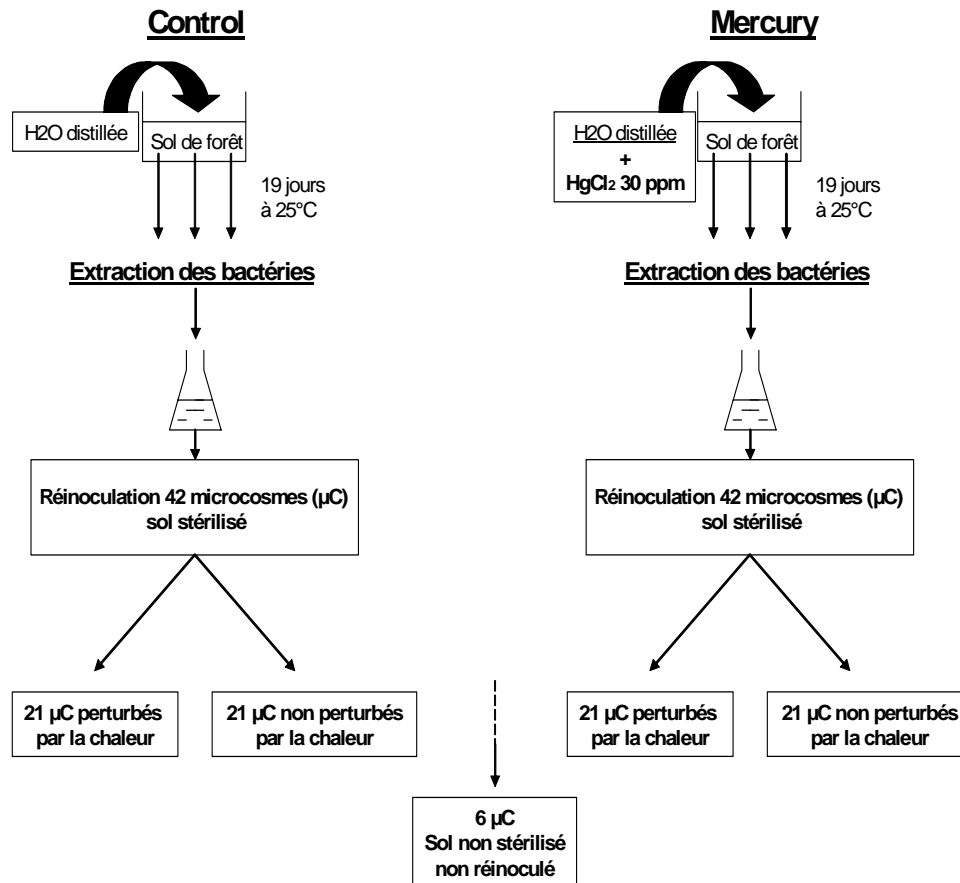


Tableau 2 : Teneurs en mercure (ppm) dans les microcosmes de sol après extraction des bactéries et pour t = 15, 30, 45 et 60 jours. Les valeurs sont les moyennes de triplicats ± erreur standard.

days	15	30	45	60
ppm Hg				
original soil				0,32 (±0,007)
control	1,49 (±0,40)	1,53 (±0,67)	1,51 (±0,68)	1,26 (±0,37)
heat	1,74 (±0,69)	1,93 (±0,72)	2,22 (±0,69)	1,75 (±0,63)
mercury	15,57 (±1,07)	12,6 (±1,10)	15,37 (±1,88)	17,6 (±4,74)
mercury + heat	23,3 (±2,40)	18,33 (±2,02)	13,06 (±5,92)	20,13 (±2,57)

2.3.2. Effet de la perturbation mercure sur la respiration et la dénitrification:

Les données concernant la respiration potentielle sont présentées dans la figure 4. Les valeurs varient de 65.73 $\mu\text{g C-CO}_2\cdot\text{g}^{-1}\text{ dw}\cdot\text{h}^{-1}$ dans les microcosmes témoins ("control") à 17.95 $\mu\text{g C-CO}_2\cdot\text{g}^{-1}\text{ dw}\cdot\text{h}^{-1}$ pour "mercury" à t=15. Il y a une augmentation constante de valeurs entre 15 et 60 jours. A t=60 jours, les valeurs de respiration potentielle sont de 114.9 et 120 $\mu\text{g C-CO}_2\cdot\text{g}^{-1}\text{ dw}\cdot\text{h}^{-1}$ respectivement pour "control" et "mercury". Aux quatre dates de prélèvement, il n'y a pas d'effets significatifs du mercure sur la respiration potentielle (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$).

En ce qui concerne la dénitrification potentielle (figure 5), les valeurs augmentent régulièrement entre t= 15 et t= 60 jours. A t = 15, elles sont de 16.30 $\text{ng N-N}_2\text{O}\cdot\text{g}^{-1}\text{ dw}\cdot\text{h}^{-1}$ pour "control" et de 2.20 $\text{ng N-N}_2\text{O}\cdot\text{g}^{-1}\text{ dw}\cdot\text{h}^{-1}$ pour les microcosmes "mercury". A t = 60 jours, la dénitrification dans les microcosmes "control" est de 101.92 $\text{ng N-N}_2\text{O}\cdot\text{g}^{-1}\text{ dw}\cdot\text{h}^{-1}$ et de 15.79 $\text{ng N-N}_2\text{O}\cdot\text{g}^{-1}\text{ dw}\cdot\text{h}^{-1}$ dans les microcosmes "mercury". Pour chaque date de prélèvement, il y a une différence significative entre les valeurs de dénitrification potentielle des microcosmes "control" et "mercury" (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$).

2.3.3. Effets du mercure sur la réponse de la respiration et de la dénitrification à la chaleur :

Les résultats sont présentés dans les figures 4 et 5. Les valeurs de respiration potentielle dans les microcosmes "heat" et "mercury++heat" sont beaucoup plus faibles que dans les témoins et cette différence se maintient durant toute l'expérience: à t=15, 28.48, 17.95 et 65.73 $\mu\text{g C-CO}_2\cdot\text{g}^{-1}\text{ dw}\cdot\text{h}^{-1}$; à t=60, 38.94, 37.40 et 114.95 $\mu\text{g C-CO}_2\cdot\text{g}^{-1}\text{ dw}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivement. A 15 et 30 jours, il y a une différence significative entre les modalités "heat" et "mercury+heat" ; alors qu'elle ne l'est plus à partir de 45 jours et jusqu'à la fin de l'expérience.

La diminution des valeurs est encore plus importante en ce qui concerne la dénitrification potentielle dans les microcosmes "mercury +heat". Toutes les valeurs de dénitrification potentielle dans ces microcosmes perturbés sont 10 à 100 fois inférieures à celles des témoins. En ce qui concerne les microcosmes "heat", les valeurs de dénitrification sont inférieures à celles des témoins et varient entre 31.35 $\text{ng N-N}_2\text{O}\cdot\text{g}^{-1}\text{ dw}\cdot\text{h}^{-1}$ à t= 15 et 50.47 $\text{ng N-N}_2\text{O}\cdot\text{g}^{-1}\text{ dw}\cdot\text{h}^{-1}$ à t=60 jours.

2.3.4. Evolution de la structure de la communauté microbienne du sol (ARISA):

Les analyses en composante principale (ACP) ont été effectuées pour trois dates de prélèvements ; t=0, 15 et 60 jours (figure 6).

A t=0, les résultats montrent une très nette différenciation des quatre communautés selon l'axe 1 (40% de la variance expliquée). Selon l'axe 2 (24% de la variance expliquée), la communauté

Figure 3: Densité bactérienne totale (AODC) dans les microcosmes pour les 4 modalités. Les valeurs sont des moyennes de triplicats \pm l'erreur standard. Pour chaque date de prélèvement, les valeurs suivies de lettres identiques ne sont pas significativement différentes (ANOVA, test post-hoc de Tukey à $p < 0.05$)

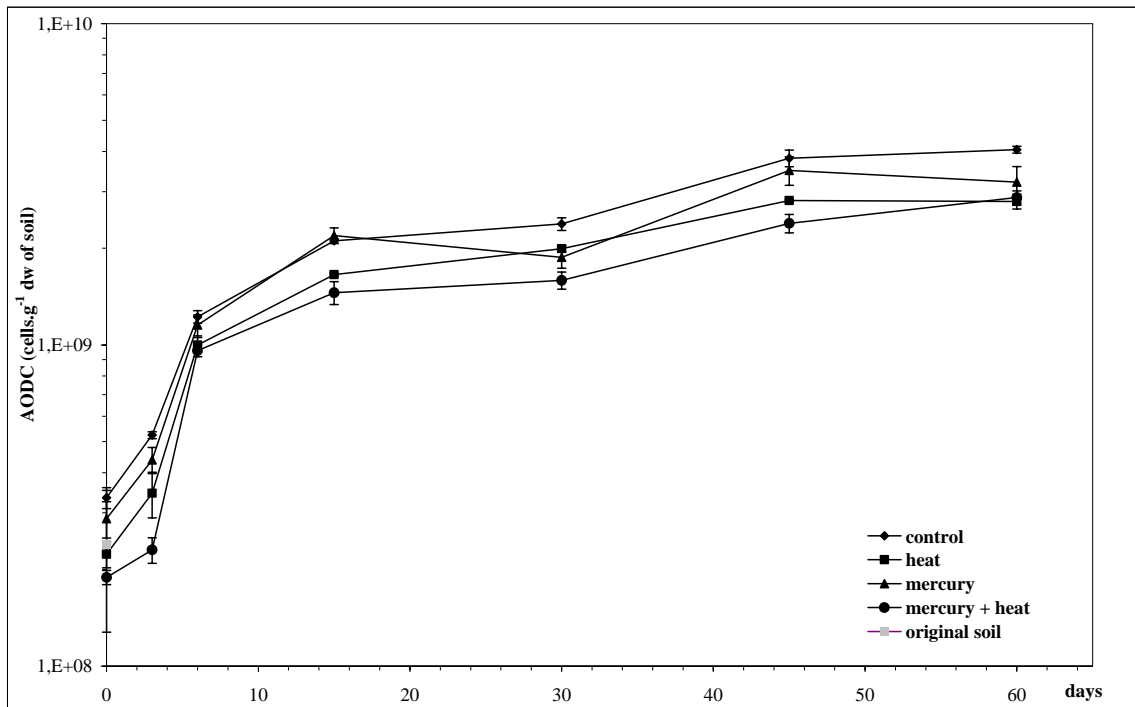
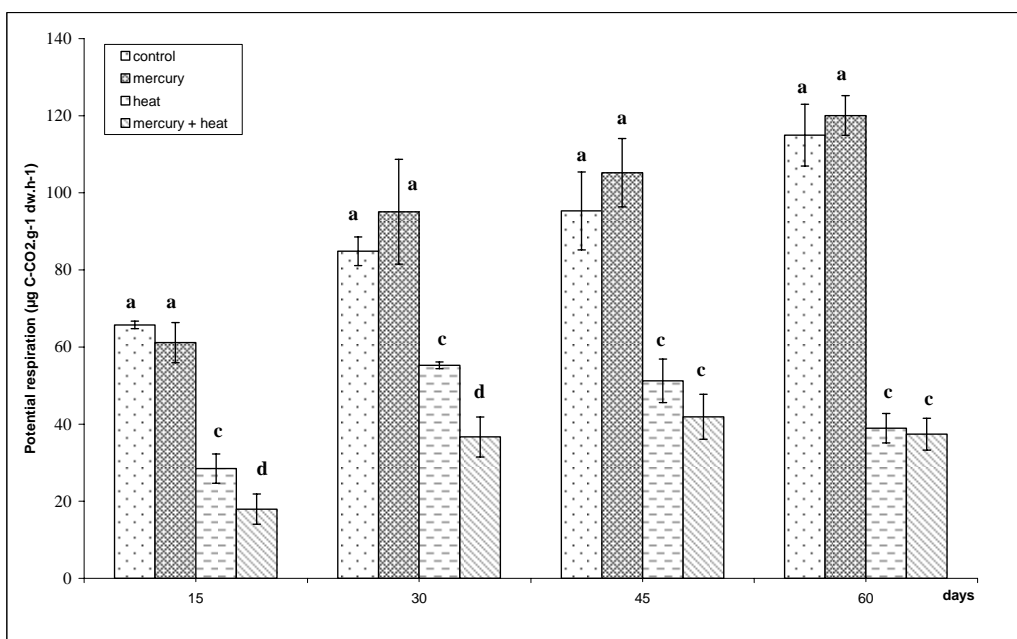


Figure 4: Respiration potentielle pour les 4 modalités et à 4 dates de prélèvement. Les valeurs sont des moyennes de triplicats \pm l'erreur standard. L'impact du mercure est évalué en comparant les microcosmes "control" à ceux "mercury"; celui de perturbations associées en comparant les microcosmes "heat" à ceux "mercury+heat". Les valeurs suivies de lettres identiques ne sont pas significativement différentes (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$).



"control" diffère des trois autres qui elles ne se différencient pas ("heat", "mercury" et "mercury+heat").

A t=15, le premier axe (28% de la variance) permet de discriminer les communautés des microcosmes témoins, de celles des microcosmes perturbés par la chaleur ("heat"), des deux séries de microcosmes perturbés par le mercure ("mercury" et "mercury+heat"). Sur l'autre axe (27% de la variance), seul les communautés "heat" se distinguent des trois autres modalités.

Enfin, à t=60, sur le premier axe (31% de la variance), on ne peut pas différencier les diversités génétiques des communautés des modalités "control", "mercury" et "mercury+chaleur". Le second axe (26% de la variance) ne permet pas de différencier les communautés bactériennes des 4 modalités.

2.4. Discussion:

2.4.1. Evolution de la densité des microorganismes:

Il était important de s'assurer d'avoir des densités de microorganismes similaires afin que la comparaison des activités ne soit pas influencée par ce paramètre, faussant ainsi les interprétations concernant le fonctionnement du sol. La phase de croissance cellulaire active (entre 0 et 15 jours) dans le sol des microcosmes des 4 modalités (tableau 2) démontre un état physiologique actif des bactéries réinoculées dans les microcosmes. Par ailleurs, malgré les incertitudes de mesure inhérentes à la méthode de dénombrement (AODC), les résultats montrent des dynamiques globalement comparables : les activités microbiennes peuvent donc être comparées entre elles sur toute la durée de l'expérience à partir du moment où les densités bactériennes se sont stabilisées, c'est-à-dire après 15 jours. Après ce laps de temps, la communauté complexe de microorganismes des microcosmes a atteint sa capacité biotique de la même manière qu'une souche pure ou une communauté simplifiée ; la capacité biotique se définissant comme la densité d'un microorganisme inoculé dans un sol stérilisé après stabilisation (Steinberg, 1987 ; Steinberg et al., 1989). Une valeur de capacité biotique est caractéristique d'une souche donnée et pour un sol donné. Néanmoins, certains auteurs ont testé cette notion avec une communauté reconstituée comprenant un petit nombre de souches nitrifiantes (Degrange *et al.*, 1997). Ils ont montré que même en changeant les proportions relatives des différents membres de la communauté, la densité après stabilisation restait constante. Dans notre cas d'étude on peut noter que les densités bactériennes ne semblent pas avoir été affectées par les deux perturbations: il n'y a pas de différence significative entre les densités bactériennes des différentes modalités, et ceci tout au long de l'expérience (tableau 2). Des précédents travaux ont pu montrer que les communautés bactériennes avaient un seuil de

Figure 5: Dénitrification potentielle pour les 4 modalités et à 4 dates de prélèvement. Les valeurs sont des moyennes de triplicats \pm l'erreur standard. L'impact du mercure est évalué en comparant les microcosmes "control" à ceux "mercure"; celui de perturbations associées en comparant les microcosmes "heat" à ceux "mercure+heat". Les valeurs suivies de lettres identiques ne sont pas significativement différentes (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$).

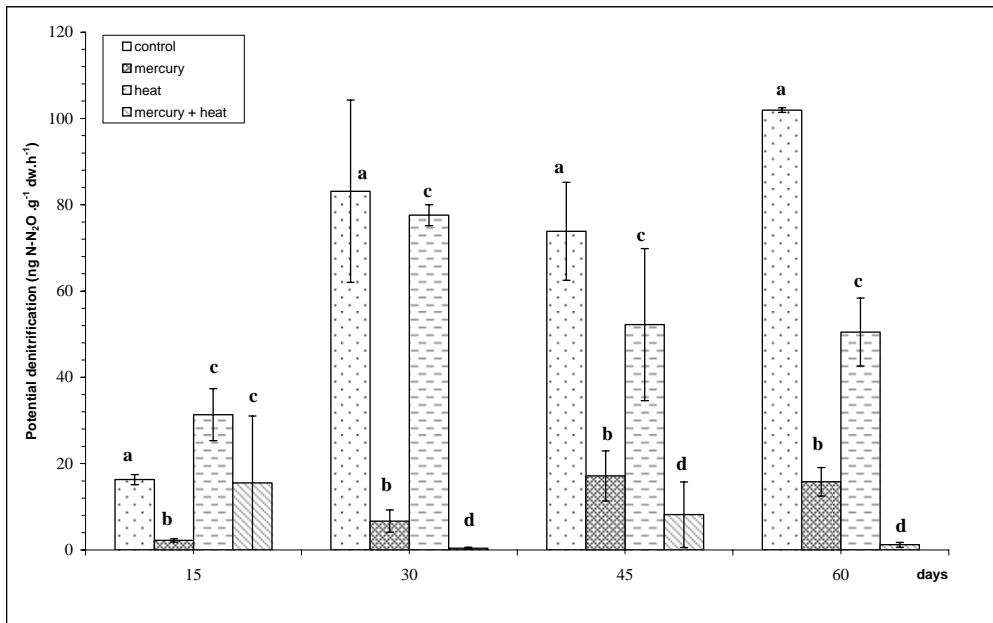
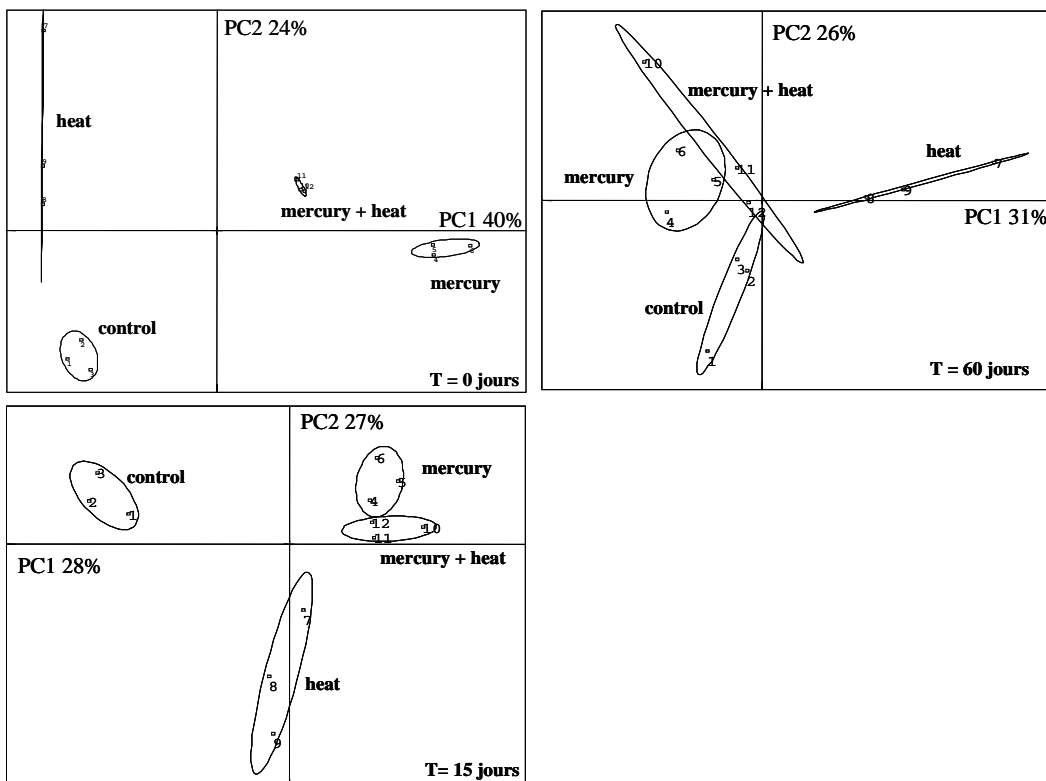


Figure 6: ACP obtenue à partir des données ARISA pour $t = 0, 15$ et 60 jours : l'analyse prend en compte les 100 premières bandes du gel pour chaque traitement et intègre leur taille et l'intensité des bandes. L'analyse est effectuée après transformation des données de l'image en données numérique (échelle = pourcentage d'explication de la variance)



tolérance au mercure qui augmentait avec le taux de mercure appliqué (Müller *et al.*, 2001). Des résultats similaires ont été trouvés avec d'autres métaux lourds de type cuivre, zinc ou cadmium (Doelman *et al.*, 1994 ; Huysman *et al.*, 1994).

2.4.2. Effet du mercure:

De nombreux travaux ont mis en évidence des effets du mercure sur les microorganismes du sol et en particulier sur la cultivabilité (Johnsen *et al.*, 2003) ainsi que sur les dynamiques proie-prédateurs des bactéries (Holze *et al.*, 2003). Le mercure induit des modifications de la structure des communautés bactériennes qui se traduisent par un passage de type stratégies-k majoritaires dans les sols non perturbés à un type stratégies-r caractéristiques des sols instables. Ceci confèrerait aux bactéries une plus grande capacité à utiliser un large spectre de sources carbonés (Rasmussen & Sorensen, 2001). Dans notre étude les effets du mercure sur les fonctions microbiennes ne sont pas les mêmes suivant la fonction considérée (figure 4 et figure 5). Les résultats montrent que si l'activité de la communauté hétérotrophe globale -appréhendée par les mesures de respiration- ne semble pas avoir été touchée, une composante de cette communauté (la communauté dénitrifiante), l'a été fortement. L'analyse de la diversité génétique des bactéries montre également un impact clair de l'application de mercure sur cette composante (figure 6). Cela implique probablement une modification de la structure de la communauté hétérotrophe globale du sol. Le maintien de cette différence de diversité, dans le temps de l'expérience, pourrait traduire des modifications durables des communautés bactériennes des sols qui d'après Rasmussen & Sorensen (2001) seraient dues à l'apparition de nouvelles espèces dominantes. Cette modification de la relation structure-fonction est corroborée par la forte diminution de la dénitrification observée dans les sols avec mercure. La réponse des communautés microbiennes du sol à la perturbation mercure est différente selon la communauté et la fonction considérée. La différence d'abondance et de diversité entre la communauté hétérotrophe globale et la communauté dénitrifiante peut expliquer la variabilité de la réponse à la perturbation. Cela traduit des modifications profondes du fonctionnement du sol que Turpeinen *et al.* (2004) ont montré suite à la perturbation de sols avec d'autres contaminants (arsenic, chromium et cuivre). Ils ont mis en évidence que les communautés microbiennes du sol répondaient à ces polluants par des modifications de leur structure et d'une sélection pour la résistance mais que cela ne se traduisait pas par des changements d'activité métabolique globale telle que la respiration. Cependant, les modifications de structure des communautés pourraient avoir un impact sur une des activités microbiennes plus spécifiques et qui correspondent à des groupes fonctionnels plus restreints tels que les dénitrifiants ou les nitrifiants. Ainsi, Griffiths *et al.* (2000a) ont montré que la fumigation par le chloroforme affectait certains processus écosystémiques sans les éliminer totalement : la nitrification (90% de diminution), la dénitrification (70%) et l'oxydation

de méthane (95%). L'ensemble de ces résultats suggère une redondance fonctionnelle importante parmi les communautés microbiennes du sol qui permet le maintien des processus écosystémiques.

2.4.3. Effet du mercure sur la vulnérabilité des sols :

Pour analyser l'impact du mercure sur la vulnérabilité des sols, nous avons voulu évaluer dans quelle mesure les sols pouvaient être atteints par deux perturbations successives. Étant donné les quantités de mercure restant dans les microcosmes après extraction des bactéries, nous avons finalement évalué l'impact de perturbations associées sur la vulnérabilité de ces sols. Dans cette optique, notre témoin est la modalité « chaleur » pour évaluer l'effet de la double perturbation. Les effets de la chaleur en tant que perturbation seule ne sont donc pas considérés. Les résultats montrent que les sols ont une plus grande vulnérabilité quand ils sont soumis au mercure et à la chaleur que lorsqu'ils sont soumis uniquement à la chaleur. On constate en particulier une diminution temporaire de la respiration potentielle, une quasi disparition de la dénitrification potentielle, lesquelles s'accompagnent d'une modification durable de la diversité génétique bactérienne. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Griffiths *et al.* (2000a ; 2001b) qui ont montré qu'une redondance fonctionnelle peut permettre à certains processus écosystémiques telles que la respiration du sol ou la décomposition de la matière organique de ne pas être affectés par une perturbation. Par contre, l'application d'une seconde perturbation peut révéler une stabilité réduite de ces processus qui pourrait s'expliquer par une perte de redondance (Loreau *et al.*, 2002). D'après de Ruyter (2004) , la stabilité d'un sol reposerait sur l'extrême diversité des communautés l'habitant mais également sur l'organisation des flux de matière et d'énergie mis à la disposition des organismes. L'impact d'une perturbation pourrait alors se traduire par une désorganisation de ces flux ayant pour conséquence une déstabilisation des communautés et une perte de diversité. Dans une perspective de management, il semble pertinent d'être capable d'évaluer, comme nous avons essayé de le faire, les capacités d'un sol à récupérer ses fonctions après de multiples stress. Ce type de démarche doit alors être capable de mettre en évidence dans les sols de possibles synergies, inhibitions ou addition des effets des perturbations. Enfin, plus généralement, une diminution de la stabilité d'un écosystème peut entraîner une moins bonne capacité de prédiction ou de détection de futurs changements environnementaux (Loreau *et al.*, 2002).

2.5. Conclusion :

Nos objectifs étaient d'examiner (1) l'impact d'une perturbation par le mercure sur le fonctionnement microbien d'un sol de forêt tropicale humide et sur son aptitude à résister à une seconde perturbation. (2) d'examiner l'impact de cette perturbation sur la relation structure fonction, et (3) d'émettre des hypothèses sur le rôle de la relation structure-fonction sur la capacité du sol à résister à une seconde perturbation associée, la chaleur. Nos résultats montrent que la réponse des communautés du sol à la perturbation varie suivant que l'on s'adresse à la communauté hétérotrophe globale ou à une fraction de celle-ci, la communauté dénitrifiante. Des mesures trop globales ne peuvent pas toujours rendre compte des modifications profondes de systèmes engendrées par des perturbations. Ce qui est rendu possible en ciblant des communautés fonctionnelles plus restreintes. La modification significative de la structure des bactéries du sol traduit des changements profonds de leur fonctionnement et en particulier de la relation structure-fonction. Un des impacts de la perturbation mercure a été de rendre les communautés du sol plus vulnérables à une seconde perturbation. Le mercure, en sélectionnant une partie de la communauté microbienne initiale, aurait diminué les capacités de redondance des fonctions ciblées, et donc induit une plus grande sensibilité à de nouveaux événements perturbants. L'ensemble des résultats vont dans le même sens que ceux de Loreau *et al.* (2002). Une autre manière de tester la vulnérabilité des sols aux perturbations serait d'induire des perturbations selon un gradient d'intensité afin d'évaluer l'amplitude dans laquelle aucuns groupes fonctionnels ou processus critiques ne sont atteints. Par ailleurs, il est aussi nécessaire de vérifier si les effets caractérisés des perturbations se maintiennent à d'autres échelles de temps et d'espace.

2.6. Bibliographie:

- Anderson T-H (2003). Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 98, 285-293
- Arshad M.A. & Martin S. (2002) Identifying critical limits for soil quality indicators in agro-ecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 88, 153-160
- Baath E., Frostegard A., Diaz-Ravina M. & Tunlid A. (1998). Microbial community-based measurements to estimate heavy metal effects in soil: the use of phospholipid fatty acid patterns and bacterial community tolerance. *Ambio*, 27, 58-61
- Chapin III F.S., Matson P.A. & Mooney H.A. Fluctuations in ecosystem processes. In: *Principles of terrestrial ecosystem ecology* (ed. Springer), pp. 283-288
- de Ruiter P.C., Griffiths B.S. & Moore J.C. (2002) Biodiversity and stability in soil ecosystems: patterns, processes and the effects of disturbance. In: *Biodiversity and Ecosystem Functioning* (ed. Michel Loreau SN, Pablo Inchausti), pp. 102-113. Oxford University Press, Oxford
- Degrange V., Lensi R. & Bardin R. (1997) Activity, size and structure of a Nitrobacter community as affected by organic carbon and nitrite in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 24, 173-180
- Doelman P., Jansen E., Michels M. & van Til M. (1994) Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecological relevant parameter. *Biology and Fertility of Soils*, 17, 177-184
- Doran J.W. (2002) Preface. Soil health as an indicator of sustainable management. *Forest Ecology and Management*, 88, 107-110
- Doran J.W. & Zeiss M.R. (2000) Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, 15, 3-11
- Firestone M.K. & Davidson E.A. (1989) Microbiological basis of NO and N₂O production and consumption in soil. In: *Exchange of gas trace between terrestrial ecosystems and the atmosphere* (eds. Andreae MO & Schimel DS), pp. 7-21. John Wiley and Sons, Berlin
- Francaviglia R., Gataleta L., Marchionni M., Trinchera A., Aromolo R., Benedetti A., Nisini L., Morselli L., Brusori B., Olivieri P. & Bernardi E. (2004) Soil quality and vulnerability in a Mediterranean natural ecosystem of Central Italy. *Chemosphere*, 55, 455-466
- Grace J. (2004) Understanding and managing the global carbon cycle. *Journal of Ecology*, 92, 189-202

- Griffiths B.S., K R., Wheatley R., Kuan H.L., Boag B., S C., F E., S.J S., Muller S. & Bloem J. (2001b) An examination of the biodiversity-ecosystem function relationship in arable soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 1713-1722
- Griffiths B.S., Ritz K, Bardgett R D, Cook R, Christensen S, Ekelund F, Sorensen S.J, Baath E, Bloem J, de Ruiter P C, Dolfing J & Nicolardot B (2000a) Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions : an examination of the biodiversity-ecosystem function relationship. *OIKOS*, 90, 279-294
- Griffiths B.S., RITZ K., Bardgett R.D., Cook R., Christensen S., Ekelund F., Sorensen S.J., Baath E., de Ruiter P.C., Dolfing J. & Nicolardot B. (2000b) Stability of soil ecosystem processes following the experimental manipulation of soil microbial community diversity. *Oikos*, 90, 279-294
- Grime J. (1997) Ecology - Biodiversity and ecosystem function: The debate deepens. *Science*, 277, 1260-1261
- Holze M.S., F E., Rasmussen L.D., Jacobsen C.S. & Johnsen K. (2003) Prey-predator dynamics in communities of culturable soil bacteria and protozoa : differential effects of mercury. *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 1175-1181
- Houghton R.A., Lawrence K.T., Hackler J.L. & Brown S. (2001) The spatial distribution of forest biomass in the Brazilian Amazon: a comparison of estimates. *Global Change Biol*, 7, 731-746
- Huysman F., Verstraete W. & Brookes P.C. (1994) Effect of manuring practices and increased copper concentrations on soils microbial populations. *Soil Biology and Biochemistry*, 26, 103-110
- Jessup C.M., Kassen R., Forde S.E., Kerr B., Buckling A., Rainey P.B. & Bohannan B.J.M. (2004) Big questions, small worlds: microbial model systems in ecology. *Trends in Ecology and Evolution*, 19, 189_197
- Johnsen K., Ekelund F., Binnerup S.J. & Rasmussen L.D. (2003) Mercury decreases culturability of *Pseudomonas frederiksbergensis* JAJ28 in soil microcosms. *Current Microbiology*, 47, 125-128
- Kepner R.L. & Pratt J.R. (1994) Use of Fluorochromes for Direct Enumeration of Total Bacteria in Environmental-Samples - Past and Present. *Microbiological Reviews*, 58, 603-615
- Lensi R., Gourbière F., Josserand A. (1985) Measurement of small amounts of nitrate in an acid soil by N₂O production. *Soil Biology and Biochemistry*, 17, 733-734
- Lensi R., Mazurier S., Gourbière F., Josserand A. (1986) Rapid determination of the nitrification potential of an acid forest soil and assessment of its variability. *Soil Biology and Biochemistry*, 18, 239-240

- Loreau M., Downing A., Emmerson M., Gonzalez A., Hughes J., Inchausti P., Joshi J., Nordberg J. & Sala O. (2002) A new look at the relationship between diversity and stability. In: *Biodiversity and Ecosystem Functioning* (ed. Loreau M, Naeem S., Inchausti P.), pp. 79-91. Oxford University Press, Oxford
- Maron P.-A., Coeur C., Pink C., Clays-Josserand A., Lensi R., Richaume A. & Potier P. (2003) Use of polyclonal antibodies to detect and quantify the NOR protein of nitrite oxidizers in complex environments. *Journal of Microbiological Methods*, 53, 87-95
- Mikola J. & Setälä H. (1998) Relating species diversity to ecosystem functioning: mechanistic backgrounds and experimental approach with a decomposer food web. *OIKOS*, 83, 180-194
- Müller A.K., Rasmussen L.D. & S.J. S. (2001) Adaptation of the bacterial community to mercury contamination. *FEMS Microbiology Letters*, 204, 49-53
- Müller A.K., Westergaard K., Christensen S & Sorensen S.J (2002) The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances. *Microbial Ecology*, 44, 49-58
- Ranjard L., Poly F, Lata J-C, Mougél C, Thioulouse J & Nazaret S (2001) Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints : biological and methodological variability. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4479-4487
- Rasmussen L.D. & Sorensen S.J. (2001) Effects of mercury contamination on the culturable heterotrophic, functional and genetic diversity of the bacterial community in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 36, 1-9
- Sala O.E., Chapin III F.S., Armesto J.J., Berlow E., Bloomfield J., Dirzo R., Huber-Sanwald E., Huenneke L.F., Jackson R.B., Kinzig A., Leemans R., Lodge D.M., Mooney H.A., Oesterheld M., Leroy Hoff N., Sykes M.T., Walker B.H., Walker M. & Wall D.H. (2000) Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100. *Science*, 287
- Tiedje J.M. (1984a) Denitrification. In: *Methods of soil analysis, part 2, chemical and microbiological properties, second edition* (ed. A L, Page, R.H. Miller, D.R.Keeney), pp. 1011-1026. American Society of Agronomy inc (ASA); Soil Science Society of America Inc (SSSA), Madison, 47
- Tiedje J.M. (1984b) Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In: *Methods of soil analysis , part 2, Chemical and microbiological properties, second edition* (ed. A L, Page, R H Miller,D R Keeney), pp. 179-244. American Society of Agronomy Inc (ASA); Soil Science Society of America Inc (SSSA), 4
- Tilman D., Wedin David & Knops Johannes (1996) Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grassland ecosystems. *Nature*, 379, 718-720

- Turpeinen R., Kairesalo T. & Häggblom M.M. (2004) Microbial community structure and activity in arsenic-, chromium- and copper-contaminated soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 47, 39-50
- Wardle D.A. & Giller K.E. (1996) The quest for a contemporary ecological dimension to soil biology. *Soil Biology and Biochemistry*, 28, 1549-1554

Chapitre 4 :

Conclusions générales et perspectives

Ce travail s'intègre dans des problématiques actuelles concernant l'impact des activités humaines sur les écosystèmes, plus spécifiquement dans une démarche visant à mieux décrire l'ampleur des dégradations. Nous avons choisi de nous focaliser sur un système déjà perturbé pour bénéficier de situations comparatives permettant de comprendre les mécanismes des réactions de l'écosystème sol. De plus, notre objet d'étude, au sein de cet écosystème forestier tropical, a été les microorganismes considérés simultanément en tant qu'acteurs de biotransformations et en tant que biodescripteurs de l'état fonctionnel du sol abordés via les communautés fonctionnelles hétérotrophes et dénitrifiantes.

Le travail s'est articulé autour de deux questions majeures posées avec des mots-clés tels que : fonction et diversité des microorganismes, fonctionnement et stabilité de l'écosystème forestier tropical, perturbation due à l'exploitation aurifère :

(1) Peut-on expliciter les relations existant entre les modalités de revégétalisation et la reconstruction des fonctionnalités d'un sol perturbé ?

(2) Quel est l'impact d'une première perturbation sur (i) le fonctionnement microbien du sol et sur (ii) la capacité du sol à résister à une seconde perturbation ?

Le premier objectif de cette thèse était d'analyser l'influence de la végétation dans les processus de restauration du fonctionnement biologique du sol après une perturbation majeure. En l'occurrence, il s'agissait de savoir si des communautés microbiennes du sol exerçant deux fonctions considérées comme représentatives du fonctionnement global pouvaient, sur un sol minier revégétalisé, récupérer des performances similaires à celles d'un sol de forêt.

Malgré une granulométrie et une texture extrêmement hétérogènes des parcelles, la plantation de légumineuses a eu pour effet de permettre un retour vers un fonctionnement du sol semblable à celui de la forêt. Si (Groffman *et al.*, 2001) ont mis en évidence une diminution des activités microbiennes des sols lors de perturbations du type changement d'usage des terres (transformation des forêts en pâturages par exemple), nos résultats montrent que ce phénomène peut être réversible dans un contexte de réhabilitation.

Les ratio respiration réelle/potentielle et dénitrification/respiration ont permis de caractériser de manière assez fine les différences de fonctionnement le long de la séquence de reforestation montrant que les sols sont en cours de reconstruction et de stabilisation. Ces ratios se sont révélés pertinents pour décrire des modifications du fonctionnement du sol dans les zones perturbées. La valeur de ratio respiration réelle/potentielle dans le sol de forêt pourrait être considérée comme un indicateur de stabilité, spécifique du site et caractérisant l'état d'équilibre à atteindre. La pertinence de ce type d'approche, utilisant des activités microbiennes fonctionnelles ainsi que des ratios, a déjà été montré par Anderson (2003) ou Nannipieri *et al.* (2002). Enfin, en permettant de détecter des variations qualitatives de la matière organique des sols qui n'avaient pas été mises en évidence par le C/N, l'utilisation de l'analyse NIRS (near infrared reflectance spectroscopy) associée aux analyses d'activités enzymatiques microbiennes a permis de vérifier que la dynamique de reconstruction des sols a été accélérée par la plantation. Ce type de résultats est à mettre en parallèle avec ceux de la littérature (Chodak *et al.*, 2002 ; Ludwig *et al.*, 2002) qui ont pu montrer la capacité de prédiction de cette méthode d'analyse pour certaines caractéristiques du sol (*i.e* teneurs en C, N, P, S).

L'utilisation d'activités microbiennes pour décrire le fonctionnement global d'un sol s'est révélée pertinente mais semble soumise à des calibrations ultérieures pour donner à ces biodescripteurs une valeur générique. En particulier, il est nécessaire de s'assurer que la respiration et la dénitrification, mesurées en activité potentielle, ont les mêmes capacités à révéler les dynamiques de restauration de fonctionnement dans d'autres types de sol et après d'autres types de perturbations. Par exemple, ces capacités de description sont-elles vérifiées dans d'autres écosystèmes ? De même, l'approche en ratio semble pertinente et capable de révéler des modifications du fonctionnement des sols ainsi que la caractérisation d'un état de stabilisation du système comparativement à un témoin non perturbé. Elle reste elle aussi soumise à une vérification sur d'autres sites et dans d'autres écosystèmes. Enfin, tout au long de ce travail nous sommes focalisés sur deux activités microbiennes hétérotrophes –la respiration et la dénitrification- que nous avons considérées comme représentatives de l'ensemble du système sol. Cependant, d'autres activités microbiennes pourraient elles-aussi se révéler appropriées : par exemple la nitrification, processus responsable de la transformation de l'ammonium en nitrate et portée par une microflore spécialisée qui peut avoir des effets importants en terme de rétention de l'azote dans l'écosystème. Cette fonction semble elle aussi être un bon modèle d'étude des mécanismes de régulation des fonctions microbiennes car extrêmement sensible aux facteurs de l'environnement (Carney *et al.*, 2004), donc capable de révéler des modifications des processus dans les sols à la suite de perturbations anthropiques. Plus en amont du cycle de transformations de la matière organique, les premières étapes de dégradation de la litière réalisées à la fois par les

fonges et les bactéries seraient elles-aussi susceptibles d'être de bons descripteurs de l'évolution de la qualité des sols suite à des perturbations. Une étape de caractérisation des communautés fonctionnelles fongiques plus délicate à mettre en œuvre serait nécessaire pour rendre compte d'un fonctionnement global de la dégradation de la litière.

Par ailleurs, la méthode NIRS pourra permettre de caractériser à une échelle plus globale, la qualité de la matière organique des sols. Pour aller plus loin, les capacités de prédiction du fonctionnement d'un sol par la NIRS pourraient être une des perspectives à développer. Il semblerait qu'il y ait une bonne corrélation entre les données contenues dans un spectre NIRS et les activités microbiennes potentielles telles que la respiration et la dénitrification. Encore est-il nécessaire de préciser et d'élargir cette corrélation. Si ces premières observations se confirmaient, l'analyse NIRS pourrait être un descripteur de la qualité beaucoup plus intégratif, prenant en compte les caractéristiques physico-chimiques et fonctionnelles des sols. Cette méthode pourrait servir à cribler rapidement et à grande échelle la variabilité des activités microbiennes et de la matière organique; étape nécessaire à la compréhension des déterminismes de la distribution spatiale et temporelle des microorganismes du sol. Plus généralement, l'utilisation de biodescripteurs de l'état de "santé" ou des capacités de récupération d'un écosystème – indicateurs microbiens fonctionnels, NIRS, ratios- permet de mieux comprendre les mécanismes qui régissent les cycles biogéochimiques et d'améliorer la capacité de prédiction des modifications des écosystèmes dues à des perturbations d'origine anthropiques ou non.

Le second axe de recherche de cette thèse a porté sur l'impact d'une première perturbation sur (1) le fonctionnement microbien du sol et sur (2) la capacité du sol à résister à une seconde perturbation.

Une première condition pour réaliser cette étude, était d'être capable d'apprécier de manière fiable la diversité des communautés considérées ou, au moins, pouvoir évaluer les biais engendrés par les méthodes utilisées. Même si d'énormes progrès ont été réalisés dans ce sens, les difficultés liées à l'évaluation *in situ* de cette diversité restent importantes. Parmi les différentes méthodes existantes ; ce sont celles basées sur les profils de fractions d'ADN après amplification par PCR qui paraissent donner le maximum d'informations en permettant des comparaisons entre différents traitements appliqués au sol (Torsvik & Ovreas, 2002). En particulier, l'ARISA semble la plus adaptée à des études systématiques impliquant un grand nombre d'échantillons à traiter (Ranjard *et al.*, 2001). La première difficulté est alors l'extraction de l'ADN du sol qui peut se faire soit en extrayant les microorganismes par gradient de densité au Nycodenz, soit en extrayant directement l'ADN du sol après éclatement des cellules (Nalin *et al.*, 1998). Les résultats obtenus montrent que l'extraction des bactéries introduit un biais de diversité par rapport à la communauté indigène,

quelque soit le type de sol étudié. L'importance relative de ce biais dépend des caractéristiques physico-chimiques du sol considéré. Le sol de Guyane apparaît le plus rétif à l'extraction des bactéries (présence importante de phénols et des produits de dégradation des sols ferrallitiques co-extraits avec l'ADN et inhibant la Taq polymérase), aussi, dans la suite de notre travail nous avons opté pour l'extraction directe de l'ADN. Enfin, si ces méthodes basées sur l'extraction d'ADN semblent bien appropriées au monde bactérien, elles restent difficiles à appliquer aux microorganismes eucaryotes (Ranjard *et al.*, 2001). Dans notre cas, nous avons utilisé la méthode ARISA pour caractériser seulement les communautés bactériennes, ce qui limite notre étude portant sur les liens entre structure et fonction, aux seuls microorganismes procaryotes. Sur le plan méthodologique, il existe plusieurs manières d'améliorer l'approche diversité-fonctionnement : une méthode est par exemple de cibler seulement la diversité des communautés concernées par les fonctions étudiées - gène *Nor* pour la dénitrification (Maron *et al.*, 2003), gène *Mer* pour la résistance au mercure (Ranjard *et al.*, 2000). La mise en évidence des liens existants entre structure génétique des communautés fonctionnelles et fonction apparaît alors plus aisée en mettant par exemple, en évidence les phénomènes de redondance pour la fonction considérée (Dahllöf, 2002).

Une fois cet aspect méthodologique résolu, l'expérience *in vitro* menée sur des microcosmes de sol a été élaborée pour mieux comprendre les impacts de perturbations sur le fonctionnement global du sol. Une première interrogation était de savoir comment les deux fonctions choisies pour représenter le fonctionnement global du sol (respiration et dénitrification) répondaient à deux types de perturbations (mercure et chaleur). Les résultats ont montré que les réponses étaient différentes suivant la perturbation et la fonction considérée: la respiration potentielle n'est pas affectée par la présence de mercure dans les sols alors que la dénitrification potentielle l'est, et inversement lorsque l'on considère les effets de la chaleur. En parallèle à ces résultats, l'analyse des communautés génétiques indique des modifications durables de la structure de ces communautés provoquées par la présence de mercure comme avaient déjà pu le montrer Rasmussen & Sorensen (2001).

Le fait que l'on puisse observer des différences de réponse entre la communauté hétérotrophe globale et celle des dénitrifiants, qui représente qu'une faible fraction de la communauté globale, pourrait être dû à la disproportion d'abondance et de diversité qui existe entre ces deux communautés. Cette différence de réponse traduit des modifications profondes du fonctionnement du sol comme a pu le montrer Turpeinen *et al.* (2004) suite à la perturbation de sols avec différents contaminants (arsenic, chrome et cuivre). Ces résultats démontrent la nécessité de prendre en considération plusieurs groupes fonctionnels de taille, de diversité et de

sensibilité différentes (Griffiths *et al.*, 2000b) pour mettre en évidence les modifications profondes subies par le sol.

Le maintien, dans certains cas, des fonctions après perturbation (respiration inchangée après l'application du mercure ; dénitrification importante malgré le choc de température) suggère une redondance fonctionnelle importante parmi les communautés microbiennes du sol. Cette redondance permettrait, d'après (Griffiths *et al.*, 2000a et 2000b) de maintenir les processus de l'écosystème malgré les perturbations qu'il subit. Pourtant l'application de mercure, semble induire une vulnérabilité plus importante des sols face à une autre perturbation (chaleur). Cette vulnérabilité se traduit par une modification du fonctionnement de la communauté hétérotrophe du sol (respiration potentielle) mais aussi par la quasi disparition de la dénitrification dans ces sols. L'application d'une seconde perturbation peut révéler une diminution de la stabilité des sols (Loreau, 2001) qui pourrait être due à la modification de diversité mise en évidence dès le début de l'expérience.

D'après de Ruiten *et al.* (2004), la stabilité d'un sol serait liée à l'extrême diversité des communautés qui l'habite ainsi qu'à l'organisation des flux de matière et d'énergie au sein de ces communautés. Les perturbations entraîneraient alors à une désorganisation de ces flux qui aurait pour conséquence la mise en place de communautés moins stables et moins diverses.

Le maintien des cycles biogéochimiques dans les écosystèmes prend de ce fait une place primordiale. La compréhension des liens entre fonction et diversité des microorganismes, entre fonctionnement et stabilité des systèmes dans le cadre d'une perturbation majeure doit permettre de mieux appréhender les mécanismes permettant le maintien de ces cycles biogéochimiques. Les services liés à ces cycles (régulation des nutriments entre autres) sont rattachés à la notion de réparation et de gestion des systèmes, donc à une intervention du type ingénierie écologique (Charles & Bernard, 2003). A l'échelle de la planète, les sociétés humaines ont un impact majeur sur les écosystèmes et des altérations de tous ordres ont déjà été mises en évidence (Sala *et al.*, 2000). La notion de services rendus par les écosystèmes développée récemment a permis de mettre en avant la nécessité de conserver, d'intervenir et de réparer les zones dégradées (Costanza *et al.*, 1997 ; de Groot *et al.*, 2002 ; Charles & Bernard, 2003). L'ensemble des questions posées au cours de cette thèse ainsi que les résultats obtenus doivent être analysés au regard de ces concepts. Plus précisément, l'expérience menée sur la Mine Boulanger a permis de montrer la réversibilité, dans une certaine mesure, de certains phénomènes liés à la dégradation du milieu par l'orpaillage ; mais aussi de mettre en exergue l'absolue nécessité de définir des biodescripteurs pertinents, capables de décrire l'état du système mais aussi sa probable évolution. Les indicateurs microbiens fonctionnels utilisés remplissent pleinement les critères définis par Nortcliff (2002) et peuvent rendre compte de la "performance" du système telle que précisée par Arshad & Martin

(2002). Même si elle peut paraître plus fondamentale, l'expérience menée en microcosmes peut se replacer dans un contexte de bioindication. Cependant, il ne s'agit plus alors de caractériser le succès d'une réhabilitation mais bien de caractériser les impacts de perturbations à l'aide de descripteurs choisis pour être représentatif de l'ensemble du sol. Le parallèle à cette approche consisterait à étudier non plus les activités microbiennes comme descriptrices mais en terme de flux. Les perturbations liées à l'orpaillage, et par extension les impacts des activités humaines, ont-elles des conséquences sur la manière dont les communautés microbiennes des sols modulent leur flux ? Certains flux peuvent-ils être significativement diminués voire supprimés, sans que la diversité de la communauté visée ne puisse compenser ? Par ailleurs, de quelle manière les modifications quantitatives et qualitatives de ces flux vont avoir des conséquences en terme de stabilité de l'écosystème ? Pour répondre à ce type de questions et mieux connaître l'impacts de perturbations sur la stabilité de communautés ou d'un processus écosystémique, de Ruitter *et al.* (2004) proposent de s'intéresser alors aux dynamiques de populations mais aussi aux réseaux trophiques et à leurs interactions. Réussir à établir un lien entre stabilité des communautés et stabilité des processus, mais aussi identifier des propriétés clés communes à ces deux concepts, pourrait alors apporter les bases d'une réelle compréhension des liens biodiversité-fonctionnement.

Références bibliographiques

1. Aber J.D. (1992) Nitrogen cycling and nitrogen saturation. *Trends in Ecology and Evolution*, 7, 220-223
2. Agren G.I. & Bosatta E. (1988) Nitrogen saturation of terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution*, 54, 185-197
3. Alkire S. (2002) Dimensions of Human Development. *World Development*, 30, 181-205
4. Allen T.F.H., Giampietro M. & Little A.M. (2003) Distinguishing ecological engineering from environmental engineering. *Ecological Engineering*, 20, 389-407
5. Anderson T.-H. (2003) Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 98, 285-293
6. Arshad M.A. & Martin S. (2002) Identifying critical limits for soil quality indicators in agro-ecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 88, 153-160
7. Baath E., Frostegard A., Diaz-Ravina M. & Tunlid A. (1998) Microbial community-based measurements to estimate heavy metal effects in soil: the use of phospholipid fatty acid patterns and bacterial community tolerance. *Ambio*, 27, 58-61
8. Barret J. (2001) *Atlas illustré de la Guyane*. IRD Editions.
9. Beare M.H., Coleman D.C., Crossley D.A., Hendrix P.F. & Odum E.P. (1995) A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. *Plant and Soil*, 170, 5-22
10. Bentham H., Harris J.A., Birch P. & Short K.C. (1992) Habitat classification and soil restoration assessment using analysis of soil microbiological and physico-chemical characteristics. *Journal of Applied Ecology*, 29, 711-718
11. Bergsma T.T., Robertson G.P. & Ostrom N.E. (2002) Influence of soil moisture and land use history on denitrification end products. *Journal of Environmental Quality*, 31, 711-717
12. Bernhard-Reversat & Fahey G.C. (1993) Dynamic of litter and organic matter at the interface in fast growing tree plantations non sandy ferrallitic soils (Congo). *Acta Oecologica*, 14, 179-195
13. Bernhard-Reversat F., G C (1993) Dynamic of litter and organic matter at the interface in fast growing tree plantations non sandy ferrallitic soils (Congo). *Acta Oecologica*, 14, 179-195
14. Bloem J., Schouten T., Sorensen S. & Breure A.M. (2003) Application of microbial indicators in ecological approaches to monitor soil quality. *Ambio*

15. Bockstaller C., Girardin P. & van der Werf H.M.G. (1997) Use of agro-ecological indicators for the evaluation of farming systems. *European Journal of Agronomy*, 7, 261-270
16. Bordères M. (2003) Les problématiques de gestion durable du massif forestier guyanais. In: *Connaissance et gestion de la forêt guyanaise*, pp. 219-234. Revue forestière française
17. Bradshaw A. (1997) Restoration of mined lands - using natural processes. *Ecological Engineering*, 8, 255-269
18. Brown S. & Lugo A.E. (1994) Rehabilitation of tropical lands : a key to sustaining development. *Restoration Ecology*, 2, 97-111
19. Butterfield R.P. (1996) Early species selection for tropical reforestation: a consideration of stability. *Forest Ecology and Management*, 81, 161-168
20. Carney K., M, Matson P.A. & Bohannan B.J.M. (2004) Diversity and composition of tropical nitrifiers across a plant diversity gradient and among land-use types. *Ecology Letters*, 7, 684-694
21. Carter M.R., Gregorich E.G., Anderson E.W., Doran J.W., Janzen H.H. & Pierce F.J. (1997) Concepts of soil quality and their significance. In: *Soil quality for crop production and ecosystem health* (eds. Gregorich EG & Carter MR), pp. 1-19. Elsevier, Amsterdam
22. Cavigelli M.A. & Robertson G.P. (2000) The functional significance of denitrifier community composition in a terrestrial ecosystem. *Ecology*, 81, 1402-1414
23. Cavigelli M.A. & Robertson G.P. (2001) Role of denitrifier diversity in rates of nitrous oxide consumption in a terrestrial ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 297-300
24. Chambers J.Q., Tribuzy E.S., Toledo L.C., Crispim B.F., Higuchi N., dos Santos J., Araujo A.C., Kruijt B., Nobre A.D. & Trumbore S.E. (2004) Respiration from a tropical forest ecosystem: Partitioning of sources and low carbon use efficiency. *Ecological Applications*, 14, S72-S88
25. Chapin III F.S., Matson P.A. & Mooney H.A. Fluctuations in ecosystem processes. In: *Principles of terrestrial ecosystem ecology* (ed. Springer), pp. 283-288
26. Charles L. & Bernard K. (2003) L'ingénierie écologique entre écologie technique et aménagement : des enjeux durables. In: *Quelles natures voulons-nous ? Pour une approche socio-écologique du champ de l'environnement* (eds. Lévêque C & Leeuw Svd), pp. 13-21. Elsevier SAS
27. Charles L. & Kalaora B. (2003) L'ingénierie écologique entre écologie, technique et aménagement : des enjeux durables. In: *Pour une approche socio-écologique du champ de l'environnement* (eds. Lévêque C & Leeuw Svd), pp. 225-235

28. Chodak M., Ludwig B., Khanna P. & Beese F. (2002) Use of near infrared spectroscopy to determine biological and chemical characteristics of organic layers under spruce and beech stands. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 165, 27-33
29. Conrad R. (1996) Soils microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiological Reviews*, 60, 609-640
30. Costanza R., d'Arge R., de Groot R., Farber S., Grasso M., Hannon B., Limburg K., Naeem S., O'Neill R., Paruelo J., Raskin R.G., Sutton P. & van den Belt M. (1997) The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature*, 387, 253-260
31. Coûteaux M.-M., Berg B. & Rovira P. (2003) Near infrared reflectance spectroscopy for determination of organic matter fractions including microbial biomass in coniferous forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 1587-1600
32. Dahllöf I. (2002) Molecular community analysis of microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 213-21
33. Daily (1995) Restoring value to the world's degraded lands. *Science*, 269, 350-354
34. Dale V.H. & Beyeler S.C. (2001) Challenges in the development and use of ecological indicators. *Ecological Indicators*, 1, 3-10
35. de Groot R.S., Wilson M.A. & Boumans R.M.J. (2002) A typology for the classification, description and valuation of ecosystem functions, goods and services. *Ecological Economics*, 41, 393-408
36. de Ruiter P.C., Griffiths B.S. & Moore J.C. (2002) Biodiversity and stability in soil ecosystems: patterns, processes and the effects of disturbance. In: *Biodiversity and Ecosystem Functioning* (ed. Michel Loreau SN, Pablo Inchausti), pp. 102-113. Oxford University Press, Oxford
37. de Ruiter P.C., Griffiths B.S. & Moore J.C. (2004) Biodiversity and stability in soil ecosystems: patterns, processes and the effects of disturbance. In: *Biodiversity and Ecosystem Functioning* (ed. Michel Loreau SN, Pablo Inchausti), pp. 102-113. Oxford University Press, Oxford
38. Degrange V., Lensi R. & Bardin R. (1997) Activity, size and structure of a Nitrobacter community as affected by organic carbon and nitrite in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 24, 173-180
39. Dendooven L., Pemberton E. & Anderson J.M. (1996) Denitrification potential and reduction enzymes dynamics in a Norway spruce plantation. *Soil Biology and Biochemistry*, 28, 151-157

40. Dighton J., Pierce F (1997) Is it possible to develop microbial test systems to evaluate pollution effects on soil nutrient cycling. In: *Ecological Risk Assessment of Contaminants in Soil* (eds. van Straalen NM & Lokke H), pp. 51-69. Chapman and Hall, London
41. Doelman P., Jansen E., Michels M. & van Til M. (1994) Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecological relevant parameter. *Biology and Fertility of Soils*, 17, 177-184
42. Doran J.W. (2002) Preface. Soil health as an indicator of sustainable management. *Forest Ecology and Management*, 88, 107-110
43. Doran J.W. & Safley M. (1997) Defining and assessing soil health and sustainable productivity. In: *Biological indicators of soil health* (eds. Pankhurst C, Doube BM & Gupta V), pp. 1-28. CAB International, Wallingford
44. Doran J.W. & Zeiss M.R. (2000) Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, 15, 3-11
45. Duraiappah A. (1998) Poverty and environmental degradation : a review and analysis of the nexus. *World Development*, 26, 2169-2179
46. Faucheux S. & Martin O.C. (2003) Le capital naturel et la demande sociale pour les biens et services environnementaux. In: *Quelles natures voulons-nous ? Pour une approche socio-écologique du champ de l'environnement* (eds. Lévêque C & Sander vdL), pp. 86-109. Elsevier SAS
47. Field C.B. & Kaduk J. (2004) The carbon balance of an old-growth forest: Building across approaches. *Ecosystems*, 7, 525-533
48. Firestone M.K. & Davidson E.A. (1989) Microbiological basis of NO and N₂O production and consumption in soil. In: *Exchange of gas trace between terrestrial ecosystems and the atmosphere* (eds. Andreae MO & Schimel DS), pp. 7-21. John Wiley and Sons, Berlin
49. Fisher R.F. (1990) Amelioration of soil by trees. In: *Sustained productivity of forest soils* (eds. Gessel SP, Lacate DS, Weetman GF & Powers RF), pp. 290-300. Faculty of Forestry, University of British Columbia, Vancouver
50. Fisher R.F. (1995) Amelioration of degraded rain forests soils by plantations of native trees. *Soil Science Society of America Journal*, 59, 544-549
51. Foley W.J., McIlwee A., Lawler I., Aragones L., Woolnough A.P. & Berding N. (1998) Ecological applications of near infrared reflectance spectroscopy - a tool for rapid, cost-effective prediction of the composition of plant and animal tissues and aspects of animal performance. *Oecologia*, 116, 293-305
52. Francaviglia R., Gataleta L., Marchionni M., Trinchera A., Aromolo R., Benedetti A., Nisini L., Morselli L., Brusori B., Olivieri P. & Bernardi E. (2004) Soil quality and

- vulnerability in a Mediterranean natural ecosystem of Central Italy. *Chemosphere*, 55, 455-466
53. Gattie D.K., Smith M.C., Tollner E.W. & McCutcheon S.C. (2003) The emergence of ecological engineering as a discipline. *Ecological Engineering*, 20, 409-420
 54. Giller K.E., Beare M.H., Lavelle P., Izac A.-M.N. & Swift M.J. (1997) Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. *Applied Soil Ecology*, 6, 3-16
 55. Glaser B., Turrion Maria-Belen & Alef Kassem (2003) Amino sugars and muramic acid-biomarkers for soil microbial community structure analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, in press
 56. Grace J. (2004) Understanding and managing the global carbon cycle. *Journal of Ecology*, 92, 189-202
 57. Griffiths B.S., K R., Wheatley R., Kuan H.L., Boag B., S C., F E., S.J S., Muller S. & Bloem J. (2001b) An examination of the biodiversity-ecosystem function relationship in arable soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 1713-1722
 58. Griffiths B.S., Ritz K, Bardgett R D, Cook R, Christensen S, Ekelund F, Sorensen S.J, Baath E, Bloem J, de Ruiter P C, Dolfing J & Nicolardot B (2000a) Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions : an examination of the biodiversity-ecosystem function relationship. *OIKOS*, 90, 279-294
 59. Griffiths B.S., RITZ K., Bardgett R.D., Cook R., Christensen S., Ekelund F., Sorensen S.J., Baath E., de Ruiter P.C., Dolfing J. & Nicolardot B. (2000b) Stability of soil ecosystem processes following the experimental manipulation of soil microbial community diversity. *Oikos*, 90, 279-294
 60. Grime J. (1997) Ecology - Biodiversity and ecosystem function: The debate deepens. *Science*, 277, 1260-1261
 61. Groffman P.M., McDowell W.H., Myers J.C. & Merriam J.L. (2001) Soil microbial biomass and activity in tropical riparian forests. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 1339-1348
 62. Gros R., Jocteur Monrozier Lucie, François B., Chotte J.-L. & Faivre Pierre (2004) Relationships between soil physical-chemical properties and microbial activity along a restoration chronosequence of alpine grasslands following ski run construction. *Applied Soil Ecology*, 27, 7-22
 63. Guariguata M.R. & Ostertag R. (2001) Neotropical secondary forest succession: changes in structural and functional characteristics. *Forest Ecology and Management*, 148, 185-206
 64. Harmon M.E., Bible K., Ryan M.G., Shaw D.C., Chen H., Klopatek J. & Li X. (2004) Production, respiration, and overall carbon balance in an old-growth *Pseudotsuga-tsuga* forest ecosystem. *Ecosystems*, 7, 498-512

65. Harris J.A. (2003) Measurements of the soil microbial community for estimating the success of restoration. *European Journal of Soil Science*, 54, 801-808
66. Hedin L.O., Armesto J.J. & Johnson A.H. (1995) Patterns of nutrient loss from unpolluted, old-growth temperate forest : evaluation of biogeochemical theory. *Ecology*, 76, 493-509
67. Hodge A., Robinson D. & Fitter A. (2000) Are microorganisms more effective than plants at competing for nitrogen ? *Trends in Plant Science*, 5, 304-308
68. Hofman J. & Dusek L. (2003) Biochemical analysis of soil organic matter and microbial biomass composition - a pilot study. *European Journal of Soil Biology*
69. Holze M.S., F E., Rasmussen L.D., Jacobsen C.S. & Johnsen K. (2003) Prey-predator dynamics in communities of culturable soil bacteria and protozoa : differential effects of mercury. *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 1175-1181
70. Homer-Dixon T.F. (1994) Environmental scarcities and violent conflict : evidence from cases. *International Security*, 19, 5-40
71. Houghton J.T., Meira Filho L.G., Callander B.A., Harris N., Kattenberg A. & Maskell K. (1996) *Climate change 1995: the science of climate change*. Cambridge University Press, Cambridge UK.
72. Houghton R.A., Lawrence K.T., Hackler J.L. & Brown S. (2001) The spatial distribution of forest biomass in the Brazilian Amazon: a comparison of estimates. *Global Change Biol*, 7, 731-746
73. Howarth R.W., Billen G., Swaney D., Townsend N., Jaworski K., Lajtha K., Downing J.A., Elmgren R., Caraco N., Jordan T., Berendse F., Freney J., Kudryarov V., Murdoch P. & Zhao-Linag Z. (1996) Regional nitrogen budgets and riverine N & P fluxes for the drainages to the North Atlantic Ocean : natural and human influences. *Biogeochemistry*, 35, 181-226
74. Hulugalle N.R. (1992) Amelioration of highly degraded tropical alfisol by planting. I Changes in soil physical and chemical properties 1989-91. *Land degradation & Rehabilitation*, 3, 141-152
75. Hüttl R.F. & Schneider B U (1998) Forest degradation and rehabilitation. *Ecological Engineering*, 10, 19-31
76. Hutton E.M.A. (1982) Selection and breeding of *Leucaena* for very acid soils. In: *Leucaena research in the Asian-Pacific region*, pp. 23-26. IRDC, Ottawa, Canada
77. Huysman F., Verstraete W. & Brookes P.C. (1994) Effect of manuring practices and increased copper concentrations on soils microbial populations. *Soil Biology and Biochemistry*, 26, 103-110
78. Jaffré T., J. P. & Rigault F. (1991) Recherches sur les possibilités d'implantation végétales sur sites miniers. In: *rapport n°4*. Convention ORSTOM/SLN, Nouméa

79. Jessup C.M., Kassen R., Forde S.E., Kerr B., Buckling A., Rainey P.B. & Bohannan B.J.M. (2004) Big questions, small worlds: microbial model systems in ecology. *Trends in Ecology and Evolution*, 19, 189-197
80. Johnsen K., Ekelund F., Binnerup S.J. & Rasmussen L.D. (2003) Mercury decreases culturability of *Pseudomonas frederiksbergensis* JAJ28 in soil microcosms. *Current Microbiology*, 47, 125-128
81. Justic N., Rabalais N.N., Turner R.E. & Dortch Q. (1995) Changes in nutrient structure of river-dominated coastal waters : stoichiometric nutrient balance and its consequences. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 40, 339-356
82. Karlen D.L., Mausbach M.J., Doran J.W., Cline R.G., Harris R.F. & Schuman G.E. (1997) Soil quality : a concept, definition and framework for evaluation. *Soil Science Society American Journal*, 61, 4-10
83. Karr J.R. & Dudley D.R. (1981) Ecological perspective on water quality goals. *Environmental Management*, 5, 55-68
84. Kepner R.L. & Pratt J.R. (1994) Use of Fluorochromes for Direct Enumeration of Total Bacteria in Environmental-Samples - Past and Present. *Microbiological Reviews*, 58, 603-615
85. Kolari P., Pumpanen J., Rannik U., Ilvesniemi H., Hari P. & Berninger F. (2004) Carbon balance of different aged Scots pine forests in Southern Finland. *Global Change Biology*, 10, 1106-1119
86. Lamb D. & Lawrence P. (1993) Mixed plantations using high value rainforest trees in Australia. In: *Restoration of tropical forest ecosystems* (ed. Lieth H, Janzen H), pp. 101-108. Kluwer Academic Publishers
87. Laughlin R.J. & Stevens R.J. (2002) Evidence for fungal dominance of denitrification and codenitrification in a grassland soil. *Soil Science Society of American Journal*, 66, 1540-1548
88. Lavorel S. & Garnier E (2001) Aardvarck to Zyzyxia - functional groups across kingdoms. *New Phytologist*, 149, 360-364
89. Le Roux X., Bardy M., Loiseau P. & Louault F. (2003) Stimulation of soil nitrification and denitrification by grazing in grasslands: do changes in plant species composition matter? *Oecologia*, 137, 417-425
90. Lensi R., Gourbière F., Jossierand A. (1985) Measurement of small amounts of nitrate in an acid soil by N₂O production. *Soil Biology and Biochemistry*, 17, 733-734

91. Lensi R., Mazurier S., Gourbière F., Josserand A. (1986) Rapid determination of the nitrification potential of an acid forest soil and assessment of its variability. *Soil Biology and Biochemistry*, 18, 239-240
92. Lévêque C. (2001) *Ecologie, de l'écosystème à la biosphère*. Dunod, Paris.
93. Lévêque C., Muxart T., Abbadie L., Weill A. & van der Leeuw S. (2003) L'anthrosystème : entité structurelle et fonctionnelle des interactions sociétés-milieus. In: *Quelles natures voulons-nous ? Pour une approche socio-écologique du champ de l'environnement* (eds. Lévêque C & Leeuw Svd), pp. 110-129. Elsevier SAS
94. Loreau M. (2001) Microbial diversity, producer-decomposer interactions and ecosystem processes : a theoretical model. *Proceeding Research of Society of Biological Science*, 268, 303-309
95. Loreau M., Downing A., Emmerson M., Gonzalez A., Hughes J., Inchausti P., Joshi J., Nordberg J. & Sala O. (2002) A new look at the relationship between diversity and stability. In: *Biodiversity and Ecosystem Functioning* (ed. Loreau M, Naeem S., Inchausti P.), pp. 79-91. Oxford University Press, Oxford
96. Ludwig B., Khanna P.K., Bauhus J. & Hopmans P. (2002) Near infrared spectroscopy of forest soils to determine chemical and biological properties related to soil sustainability. *Forest Ecology and Management*, 171, 121-132
97. Lugo A.E. (1992) Tree plantations for rehabilitating damaged forest lands in tropics. In: *Ecosystems Rehabilitation, volume 2 : Ecosystem analysis and synthesis* (ed. Wali MK), pp. 247-255. SPB Academic Publisher, The Hague, Netherlands
98. Malhi Y. & Grace J. (2000) Tropical forests and atmospheric carbon dioxide. *Trends in Ecology and Evolution*, 15, 332-337
99. Mao D.M., Min Y.W., Yu L., Martens R. & Insam H. (1992) Affect of afforestation on microbial biomass and activity in soils of tropical China. *Soil Biology and Biochemistry*, 24, 865-872
100. Maron P.-A., Coeur C., Pink C., Clays-Josserand A., Lensi R., Richaume A. & Potier P. (2003) Use of polyclonal antibodies to detect and quantify the NOR protein of nitrite oxidizers in complex environments. *Journal of Microbiological Methods*, 53, 87-95
101. Merckle A. & Kaupenjohann M. (2000) Derivation of ecosystemic effect indicators - method. *Ecological Modelling*, 130, 39-46
102. Michon G. (2003) Sciences sociales et biodiversité: des problématiques nouvelles pour un contexte nouveau. *Natures Sciences et Sociétés*, 11, 421-431

103. Mikola J. & Setälä H. (1998) Relating species diversity to ecosystem functioning: mechanistic backgrounds and experimental approach with a decomposer food web. *OIKOS*, 83, 180-194
104. Moberg F. & Folke C. (1999) Ecological goods and services of coral reef ecosystems. *Ecological Economics*, 29, 215-233
105. Mouron R., Michel J.-C. & Vazquez Lopez R. (2001) Panorama des activités minières en France en 1999. Chroniques de la Recherche Minière I. In:
106. Müller A.K., Rasmussen L.D. & S.J.S. (2001) Adaptation of the bacterial community to mercury contamination. *FEMS Microbiology Letters*, 204, 49-53
107. Müller A.K., Westergaard K., Christensen S & Sørensen S.J (2002a) The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances. *Microbial Ecology*, 44, 49-58
108. Müller C., Martin M., Stevens R.J., Laughlin R.J., Kammann C., Ottow J.C.G. & Jäger H.-J. (2002b) Processes leading to N₂O emissions in grassland soil during freezing and thawing. *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 1325-1331
109. Müller T. & Höper H. (2004) Soil organic matter turnover as a function of the soil clay content: consequences for model application. *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 877-888
110. Murray P.J., Hatch D.J., Dixon E.R., Stevens R.J., Laughlin R.J. & Jarvis S.C. (2004) Denitrification potential in a grassland subsoil: effect of carbon substrates. *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 545-547
111. Nalin R., Ranjard L, Nazaret S & Simonet P. (1998) La biologie moléculaire en écologie microbienne du sol : application à l'analyse de la structure des communautés microbiennes. *Bulletin de la Société Française de Microbiologie*, 13, 21-25
112. Nannipieri P., Ascher J, Ceccherini M T, Landig L, Pietramellara G & Renella G (2003) Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54, 655-670
113. Nannipieri P., Kandeler E.K. & Ruggiero P. (2002) Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: *Enzymes in the Environments* (eds. Burns RG & Dick R), pp. 1-33. Marcel Dekker, New York
114. Norberg J. (1999) Linking Nature's services to ecosystems: some general ecological concepts. *Ecological Economics*, 29, 183-202
115. Nortcliff S. (2002) Standardisation of soil quality attributes. *Forest Ecology and Management*, 88, 161-168

116. O'Donnell A., Seasman Melanie, Macrae Andrew, Waite Ian & Davies John T (2001) plants and fertilisers as drivers of change in microbial community structure and function in soils. *Plant and Soil*, 232, 135-145
117. Odum H.T. & Odum B. (2003) Concepts and methods of ecological engineering. *Ecological Engineering*, 20, 339-361
118. Osborne B.G., Fearn T. & Hindle P.H. (1993) *Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis*, Singapore.
119. Palmborg C. & Nordgren A. (1993) Modelling microbial activity and biomass in forest soil with substrate quality measured using near infrared reflectance spectroscopy. *Soil Biology and Biochemistry*, 25, 713-718
120. Palmborg C. & Nordgren A. (1996) Partitioning the variation of microbial measurements in forest soils into heavy metal and substrate quality dependent parts by use of near infrared spectroscopy and multivariate statistics. *Soil Biology and Biochemistry*, 28, 711-720
121. Palmborg C., Nordgren A. & Baath E. (1998) Multivariate modelling of soil microbial variables in forest soil contaminated by heavy metals using wet chemical analyses and pyrolysis GC/MS. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 345-357
122. Pankhurst C.E.K., Doube B.M. & Gupta V. (1997) Biological indicators of soil health : synthesis. In: *Biological indicators of soil health* (eds. Pankhurst CE, Doube BM & Gupta V), pp. 419-435. CAB International, Wallingford
123. Parrotta J.A. (1992) The role of plantation forests in rehabilitating degraded tropical ecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 41, 115-133
124. Parrotta J.A. (1993) Secondary forest regeneration on degraded tropical lands. In: *Restoration of tropical forest ecosystems* (eds. Lieth H, Janzen H & Lohmann MA), pp. 63-73. Kluwer Academic Publishers
125. Parrotta J.A. & Knowles O.H. (2001) Restoring tropical forests on lands mined for bauxite: Examples from the Brazilian Amazon. *Ecological Engineering*, 17, 219-239
126. Parry S., Renault P., Chenu C. & Lensi R. (1999) Denitrification in pasture and cropped soil clods as affected by pore space structure. *Soil Biology and Biochemistry*, 31, 493-501
127. Parton W.J., Mosier A.R., Ojima D.S., Valentine D.W., Schimel D.S., Weier K. & Kulmala A.E. (1995) Generalized model for N₂ and N₂O production from nitrification and denitrification. *Global Biogeochemical Cycles*, 10, 401-412

128. Picot J., Bornuat M., Hocquart C., Milési J.-P. & Zeegers H. (1995) L'or en Guyane, géologie, gîtes, potentialités. Quel avenir pour l'an 2000 ? In: (ed. l'industrie EB-Md), p. 116p
129. Puig H. (2001) *La forêt tropicale humide*. Editions Belin.
130. Ramakrishna R.S. & Narasimham R.L. (1988) Effects of soil compaction in sugarcane: part I on soil moisture, porosity and nitrification. *International Journal of Tropical Agriculture*, 6, 221-226
131. Ranjard L., Brothier E & Nazaret S (2000a) Sequencing bands of ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints for characterization and microscale distribution of soil bacterium populations responding to mercury spiking. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5334-5339
132. Ranjard L., Poly F, Lata J-C, Mougel C, Thioulouse J & Nazaret S (2001) Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints : biological and methodological variability. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4479-4487
133. Ranjard L., Poly F & Nazaret S. (2000b) Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques : application to soil environment. *Research in Microbiology*, 151, 167-177
134. Ranjard L. & Richaume A. (2001) Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Research in Microbiology*, 152, 707-716
135. Rasmussen L.D. & Sorensen S.J. (2001) Effects of mercury contamination on the culturable heterotrophic, functional and genetic diversity of the bacterial community in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 36, 1-9
136. Rasmussen R.A. & Khalil M.A.K. (1986) Atmospheric trace gases : trends and distributions over the last decade. *Science*, 232, 1623-1624
137. Rice A.H., Pyle E.H., Saleska S.R., Hutyra L., Palace M., Keller M., de Camargo P.B., Portilho K., Marques D.F. & Wofsy S.C. (2004) Carbon balance and vegetation dynamics in an old-growth Amazonian forest. *Ecological Applications*, 14, S55-S71
138. Rillig M.C., Wright S.F., Allen M.F. & Field C.B. (1999) Rise in carbon dioxide changes soil structure. *Nature*, 400, 628
139. Robertson G.P., Paul E.A. & Harwood R.R. (2000) Greenhouse gases in intensive agriculture: contributions of individual gases to the radiative forcing of the atmosphere. *Science*, 289, 1922-1925
140. Röver M., Heinemeyer O. & Kaiser E.A. (1998) Microbial induced nitrous oxide emissions from arable soil during winter. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 1859-1865

141. Sala O.E., Chapin III F.S., Armesto J.J., Berlow E., Bloomfield J., Dirzo R., Huber-Sanwald E., Huenneke L.F., Jackson R.B., Kinzig A., Leemans R., Lodge D.M., Mooney H.A., Oesterheld M., Leroy Hoff N., Sykes M.T., Walker B.H., Walker M. & Wall D.H. (2000) Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100. *Science*, 287
142. Sarrailh J.M. (1990) L'opération ECEREX. Etudes sur la mise en valeur de l'écosystème forestier guyanais. Après déboisement. Le point sur les recherches en cours. *Bois et Forêts des Tropiques*, 219, Spécial Guyane, 79-97
143. Schimel D.S., Enting I.G., Heimann M., Wigley T.M.L., Raynard D., Alves D. & Siegenthaler U. (1995) CO₂ and the carbon cycle. In: *Climate change 1994 : radiative forcing of climate change* (eds. Houghton JT, Meira Filho LG, Bruce J, Lee H, Callander BA, Haites E, Harris N & Maskell K), pp. 39-75. Cambridge University Press, Cambridge
144. Schloter M., Dilly O. & Munch J. (2003) Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 98, 255-262
145. Shoun H., Kim D.-H., Uchiyama H. & Sugiyama J. (1992) Denitrification by fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 94, 277-281
146. Shoun H. & Tanimoto T. (1991) Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* and involvement of cytochrome P-450 in the respiratory nitrite reduction. *Journal of Biology and Chemistry*, 266, 11078-11082
147. Slocombe D.S. (1998) Defining goals and criteria for ecosystem-based management. *Environmental Management*, 2, 483-493
148. Smil V. (1997) Global population and the nitrogen cycle. *Scientific American*, 76-81
149. Stres B., Mahne I, Avgustin G & Tiedje J.M. (2004) Nitrous oxide reductase (nasZ) gene fragments differ between native and cultivated Michigan soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 301-309
150. Suzuki D. (2005) Ecosystem assessment provides baseline. URL <http://www.millenniumassessment.org/en/index.aspx>
151. Tiedje J.M. (1984a) Denitrification. In: *Methods of soil analysis, part 2, chemical and microbiological properties, second edition* (ed. A L, Page, R.H. Miller, D.R.Keeney), pp. 1011-1026. American Society of Agronomy inc (ASA); Soil Science Society of America Inc (SSSA), Madison, 47
152. Tiedje J.M. (1984b) Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In: *Methods of soil analysis , part 2, Chemical and microbiological properties, second edition* (ed. A L, Page, R H Miller,D R Keeney), pp. 179-244. American Society of Agronomy Inc (ASA); Soil Science Society of America Inc (SSSA), 4

153. Tilki F. & Fisher R.F. (1998) Tropical leguminous species for acid soils : studies on plant form and growth in Costa Rica. *Forest Ecology and Management*, 108, 175-192
154. Tilman D., Wedin David & Knops Johannes (1996) Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grassland ecosystems. *Nature*, 379, 718-720
155. Torsvik V. & Ovreas L. (2002) Microbial diversity and function in soil : from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5, 240-245
156. Tscherko D. & Kandeler E. (1999) Classification and monitoring of soil microbial biomass, N-mineralization and enzyme activities to indicate environmental changes. *Die Bodenkultur*, 50, 215-226
157. Tsutui H. (1991) Agricultural development and environmental conservation (Policy of FAO). *Irrigation Engineering and Rural Planning*, 21, 49-65
158. Turpeinen R., Kairesalo T. & Häggblom M.M. (2004) Microbial community structure and activity inn arsenic-, chromium- and copper-contaminated soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 47, 39-50
159. Van Dijk A. & Dolman A.J. (2004) Estimates of CO₂ uptake and release among European forests based on eddy covariance data. *Global Change Biology*, 10, 1445-1459
160. Vance C.P. (2001) Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiology*, 127, 390-397
161. Vitousek P.M., Aber J.D., Howarth R.W., Likens G.E., Matson P.A., Schindler D.W., Schlesinger W.H. & Tilman D.G. (1997) Human alteration of the global nitrogen cycle : sources and consequences. *Ecological Applications*, 7, 737-750
162. Wardle D.A. (2002) Ecosystem structures across above and below ground. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 17, 584-585
163. Wardle D.A. & Giller K.E. (1996) The quest for a contemporary ecological dimension to soil biology. *Soil Biology and Biochemistry*, 28, 1549-1554
164. White D.C., Flemming C.A., Leung K.T. & Macnaughton S.J. (1998) In situ microbial ecology for quantitative appraisal, monitoring, and risk assessment of pollution remediation in soils, the subsurface, the rhizosphere and in biofilms. *Journal of Microbiological Methods*, 32, 93-105
165. Zumft W.G. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 533-616

Résumé:

Ce travail s'intègre dans des problématiques actuelles cherchant à caractériser l'impact des activités humaines sur les écosystèmes. Le sol, et en particulier, les communautés microbiennes fonctionnelles, abordées simultanément en tant qu'actrices des bio-transformations et en tant que biodescriptrices de l'état fonctionnel du système, ont été l'objet d'étude de ce travail qui s'est articulé autour de deux questions majeures :
- Il s'agissait de savoir si des communautés microbiennes du sol exerçant deux fonctions considérées comme représentatives du fonctionnement global (respiration et dénitrification) pouvaient, sur un sol minier revégétalisé, récupérer des performances similaires à celles d'un sol de forêt. Cette étude menée *in situ* en forêt guyanaise, sur une zone minière aurifère réhabilitée a montré une certaine réversibilité des activités microbiennes des sols observées lors d'une telle perturbation. En effet, malgré une texture extrêmement hétérogène, le sol, une fois replanté en légumineuses, retrouve un fonctionnement similaire à celui de la forêt. Les biodescripteurs utilisés (ratio respiration réelle/potentielle et dénitrification/respiration) ont permis de caractériser les différences de fonctionnement le long de la séquence de reforestation. Ils se sont révélés pertinents pour décrire les sols en cours de reconstruction et de stabilisation. La valeur de ratio respiration réelle/potentielle dans un sol de forêt pourrait être considérée comme un indicateur de stabilité, spécifique du site et caractérisant l'état d'équilibre à atteindre. Enfin, en permettant de détecter des variations qualitatives de la matière organique des sols qui n'avaient pas été mises en évidence par le C/N, l'utilisation de l'analyse NIRS associée aux analyses d'activité enzymatiques microbiennes a permis de vérifier que la dynamique de reconstruction des sols avait été accélérée par la plantation.

La seconde question majeure de ce travail était : quel est l'impact d'une première perturbation sur (i) la structure et le fonctionnement microbien du sol et sur (ii) la capacité du sol à résister à une seconde perturbation ? Pour y répondre, une expérience *in vitro* menée sur des microcosmes de sol subissant deux types de perturbations (mercure et chaleur) a été élaborée. Les résultats ont montré que la respiration et la dénitrification répondaient d'une manière différente avec, parallèlement, des modifications durables de la structure des communautés. La diversité génétique des communautés microbiennes du sol a été évaluée à l'aide d'une ARISA après une extraction directe de l'ADN du sol. Au préalable, une étude méthodologique avait permis d'évaluer les biais engendrés par différentes méthodes d'extraction de l'ADN et donc de choisir l'extraction directe de l'ADN. Le maintien, dans certains cas, des fonctions après perturbation (respiration inchangée après l'application du mercure ; dénitrification importante malgré le choc de température) suggère une redondance fonctionnelle importante parmi les communautés microbiennes du sol. Pourtant l'application de mercure, semble induire une vulnérabilité plus importante des sols face à une autre perturbation (chaleur). Cette vulnérabilité se traduit par une modification du fonctionnement de la communauté hétérotrophe du sol (respiration potentielle) mais aussi par la quasi disparition de la dénitrification dans ces sols. Cela peut révéler une diminution de la stabilité des sols qui pourrait être due à la modification de diversité mise en évidence dès le début de l'expérience.

L'ensemble des résultats posés au cours de ce travail doit être analysé au regard des concepts de maintien des cycles biogéochimiques et d'ingénierie écologique. Les expériences menées aussi bien sur la Mine Boulanger qu'en microcosmes ont permis de mettre en exergue la nécessité de définir des biodescripteurs pertinents, capables de décrire l'état du système mais aussi sa probable évolution. Les indicateurs microbiens fonctionnels utilisés semblent remplir cette fonction en étant capables de rendre compte de la "performance" du système, de sa possibilité à être réhabilité ou à résister aux perturbations

Mots-clés: écosystème forestier tropical, perturbations biodescripteur fonctionnel microbien, respiration, dénitrification, ratio, plantation, mercure, chaleur, NIRS

Summary:

The degradations caused by human activities on ecosystems and the characterization of their extent constitute the context of this work. Soil and its microbial functional communities, approached simultaneously as actors of biotransformations and as biodescriptors of the functioning state of the soil, were the study objects of this work, organized around two major questions:

- The objectives, first, were to evaluate if soil microbial communities carrying two functions considered as representative of the global functioning (respiration and denitrification) were able, on a rehabilitated mining soil, to recover capacities close to the ones found in forest soil. This study, realized *in situ* in the French Guyana forest on a rehabilitated gold mine showed that the decrease of the soil microbial activities observed in such a disturbance is more or less reversible. It is possible to recover a soil functioning similar to the one in forest with Legumes plantations and despite a granulometry extremely heterogeneous. Biodescriptors used ("actual"/potential respiration and denitrification/respiration) allowed characterizing differences of functioning along the sequence of reforestation and showing that soils were recovering and stabilizing. Values of the ratio "actual"/potential respiration in a forest soil could be considered as a stability indicator, site-specific and characterizing the equilibrium state to reach. NIRS analysis associated with microbial enzymatic activities analysis allowed confirming the acceleration of the soil reconstruction dynamic by the plantation because of the detection of qualitative variations of the soil organic matter that the C/N measures didn't identify.

The second major question was: what is the impact of a first perturbation on (i) soil microbial functioning and (ii) on the capacity of soil to resist to a second disturbance? One *in vitro* experimentation was then elaborated in soil microcosms to understand impacts of two disturbances (mercury and heat) on the global soil functioning. Results showed that respiration and denitrification differently responded to the two different perturbations and that was combined with long-lasting modifications of the community structure. Genetic diversity was analyzed with an ARISA after direct soil DNA extraction. A first methodological study allowed evaluating the biases caused by different soil DNA extraction and chooses the direct extraction of DNA from soil. The maintenance, in some cases, of soils functions after a perturbation (unchanged respiration but decreasing denitrification after mercury) suggests an important functional redundancy in the soil microbial communities. Mercury application seemed to lead to a more important vulnerability of soils in case of second perturbation (heat). This vulnerability appears by a modification of the soil heterotrophic community functioning (respiration) but also by a huge decrease of the denitrification. As the second disturbance was applied, a diminution of the stability of these soils appeared due to the modification of the diversity shown sooner.

All these results have to be analyzed toward the concepts of maintenance of biogeochemical cycles and ecological engineering. Experiences realized both on the Mine Boulanger and in soil microcosms allowed underlining the necessity to set up relevant biodescriptors able to evaluate the state of the system and its probable evolution. Microbial functional indicators used along this work were able to evaluate the performance of the system and also its ability to be rehabilitated or to resist to disturbances.

Key -words: tropical forest ecosystem, perturbations microbial functional biodescriptor, respiration, denitrification, ratio, plantation, mercury, heat, NIRS