

Impact du potentiel matriciel sur la biodégradation de résidus végétaux - Evolution spatio-temporelle de la détritusphère

Charlotte Vedere

▶ **To cite this version:**

Charlotte Vedere. Impact du potentiel matriciel sur la biodégradation de résidus végétaux - Evolution spatio-temporelle de la détritusphère. Science des sols. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASB014 . tel-03181169

HAL Id: tel-03181169
https://pastel.hal.science/tel-03181169

Submitted on 25 Mar 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

université PARIS-SACLAY

Impact du potentiel matriciel sur la biodégradation de résidus végétaux – Évolution spatio-temporelle de la détritusphère

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 581 : Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)
Spécialité de doctorat: Sciences du sol
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR ECOSYS, 78850, Thiverval-Grignon, France.
Référent : AgroParisTech

Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay, le 05/11/2020, par

Charlotte VÉDÈRE

Composition du Jury

Yves COQUET Professeur, AgroParisTech (UMR ECOSYS, Grignon)	Président
Isabelle BASILE-DOELSCH Directrice de recherche, INRAE (CEREGE, Aix-en-Provence)	Rapporteur & Examinatrice
Ellen KANDELER Professeure, Université de Hohenheim (IBS, Stuttgart)	Rapporteur & Examinatrice
Yves COQUET Professeur, AgroParisTech (UMR ECOSYS, Grignon)	Examinateur
Jean MARTINS Directeur de recherche, CNRS (IGE, Grenoble)	Examinateur
Claire CHENU Professeure, INRAE (UMR ECOSYS, Grignon)	Directrice de thèse
Laure VIEUBLÉ-GONOD Maître de conférences, AgroParisTech (UMR ECOSYS, Grignon)	Co-encadrante & Examinatrice

Thèse de doctorat
NNT: 2020UPASB014

Abstract

As a result of the heterogeneous spatial distribution of both microorganisms and substrates in soil and the restricted access to substrate that this entails for microbial communities, biodegradation occurs mainly in hot-spots, such as the detritusphere, which is induced by decomposing plant residues. An understanding of the properties and characteristics of soil volumes in which the decomposition of a given organic substrate occurs is likely to help understanding and predicting the process of biodegradation.

Our objectives were: (i) to identify the volume of soil involved in the biodegradation of plant residues and (ii) to determine to what extent this volume is affected by soil moisture under diffusive conditions, by monitoring the mineralisation and spatio-temporal evolution of residues-C and microorganisms at the scale of the microbial habitat.

We incubated repacked soil cores, with a central layer of ^{13}C labelled maize residues at three different matric potentials. We monitored the ^{13}C and total C mineralisation during an incubation that lasted 601 days. We sampled soil slices at different distances from the residues on days 3, 7, 15 and 45 of incubation and analysed their ^{13}C content (i.e. C from the residues). We also measured the structure of the total and active microbial communities by PLFA and ^{13}C-PLFA profiling. Thin sections for fluorescence and nanoSIMS observations were also prepared.

Carbon mineralisation and the "priming effect" increased with soil moisture, but after 70 days incubation, they both became higher than expected in dry conditions. The speed with which a detritusphere of a few mm in thickness was function of the moisture content, with ^{13}C, total and ^{13}C PLFA and bacterial coloniy density increasing as the distance to the residues layer decreased. Most ^{13}C from the residues was located in the first two mm from the detritusphere and this was not affected by the matric potential. The degrading microbial communities were different from the total microbial communities, but were similar to one another in wet and dry conditions. Both bacteria and fungi were involved in the biodegradation after 7 days of incubation. The use of image analysis methods and spatial point processes to analyse the bacterial spatial distribution data relatively one to each other and an in relation to macropores allowed us to obtain micro-scale data in soil science on the spatial distribution of soil microorganisms that is rare in soil science. The aggregation of microorganisms does not seem to be affected by either water content or proximity to the residues. However, distribution gradients of microorganisms around macropores were steeper in dry than wet conditions and in proximity to the residues. The NanoSIMS observations did not give very reliable results on the spatial distribution of degrading microorganisms but were consistent with a rapid assimilation of the available carbon resources after a few days of incubation.

Few data were available on the spatial distribution of soil microorganisms and on hot spots of microbial activity under dry conditions. We found more generally that in the case of dry soil, some of the processes occured more slowly (establishment of the detritusphere, development of fungi, biodegradation, priming effect, distribution of microorganisms around the pores, etc.), however, their intensity was not reduced.

Résumé

En raison de la distribution spatiale hétérogène des micro-organismes et des substrats dans le sol et de l'accessibilité restreinte, la biodégradation se produit principalement dans des hotspots, comme dans la détritusphère induite par la décomposition des résidus végétaux. Connaître les caractéristiques du volume de sol impliqué dans la décomposition d'un substrat organique donné aiderait à comprendre et à prédire leur biodégradation, alors que cette information n'est pas encore connue dans le cas de sols secs. Nos objectifs étaient: (i) d'identifier le volume de sol impliqué dans la biodégradation de résidus végétaux et (ii) de déterminer dans quelle mesure ce volume est affecté par l'humidité du sol en conditions diffusives, en effectuant un suivi de la minéralisation et de l'évolution spatio-temporelle du C des résidus et des microorganismes dans le sol à l'échelle de l'habitat microbien.

Nous avons incubé des cosmes de sol remaniés comprenant une couche centrale de résidus de maïs marqués ^{13}C à trois potentiels matriciels contrastés. Nous avons effectué un suivi de la minéralisation du ^{13}C et du C total sur 601 jours d'incubation, avons séparé les tranches de sol à des distances croissantes des résidus à 3, 7, 15 et 45 jours et y avons analysé le ^{13}C du résidu, la structure de la communauté microbienne et son activité par analyses des PLFA et ^{13}C-PLFA, mais aussi préparé des lames minces de sol pour des observations en fluorescence et nanoSIMS.

La minéralisation et le priming effect augmentent avec l'humidité du sol, mais au-delà de 70 jours, ils deviennent tous les deux plus importants que ce qui était attendu en conditions sèches. Une détritusphère de quelques mm d'épaisseur s'établit d'autant plus rapidement que l'humidité du sol augmente, avec un gradient croissant de ^{13}C, de PLFA, de ^{13}C-PLFA vers la couche de résidus. La plupart du ^{13}C des résidus était situé dans les deux premiers millimètres de la détritusphère et la quantité de C transféré dépendait peu du potentiel matriciel. Les communautés microbiennes dégradantes étaient différentes des communautés totales mais similaires en conditions humides et sèches. Bactéries et champignons étaient impliqués dans la biodégradation après 7 jours d'incubation. L'utilisation de méthodes d'analyses de répartition de points entre eux et par rapport aux macropores nous a permis d'obtenir des données peu répandues à micro-échelle sur la répartition des microorganismes du sol. L'agrégation des microorganismes semble peu affectée par la teneur en eau et la proximité du résidu. En revanche, les gradients de répartition des microorganismes autour des macropores étaient plus forts en conditions sèches qu'humides et au contact du résidu. Les observations NanoSIMS n'ont pas pu donner de résultats très fiables mais étaient cohérents avec une assimilation rapide des ressources disponibles après quelques jours d'incubation.

Il semble plus généralement que dans le cas du sol sec une partie des processus soient plus lents (apparition de la détritusphère, développement de champignons, biodégradation, priming effect, répartition des microorganismes autour des pores, etc.) mais leur intensité n'en est pas pour autant amoindrie.

Remerciements

En premier lieu je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse: Ellen Kandeler, Isabelle Basile Doelsch, Jean Martins et Yves Coquet, qui ont accepté de relire et examiner ma thèse. J'espère que vous aurez apprécié la lecture de ce travail autant que j'ai apprécié le mener.

Un immense merci à mes encadrantes : Claire Chenu et Laure Vieublé (Capitaine) dont les conseils et le soutient ont été indispensables et inconditionnels. Merci beaucoup pour l'assurance et la confiance que vous m'avez accordées. Je pense pouvoir affirmer que j'ai eu beaucoup de chance d'avoir deux directrices aussi attentives et patientes.

Merci également aux membres de mon comité de pilotage : Patricia Garnier, Sylvie Recous, Naoise Nunan et Pierre-Alain Maron pour leurs conseils précieux.

Je voudrais aussi tout particulièrement remercier les gens qui m'ont formé sur tous les aspects techniques et scientifiques m'aidant à prendre confiance en moi dans un environnement parfois totalement nouveau. Merci à Valérie et Cyril pour tous vos conseils concernant les protocoles et les techniques utilisées. Je me souviens que ce fut parfois compliqué et que je me suis à de nombreuses reprises dit que je n'arriverais pas à atteindre mes objectifs quand vous m'assuriez que c'était juste une question de pratique. Evidemment, vu votre expérience et votre pédagogie dans ces domaines, c'est vous qui aviez raison et j'étais capable. Par ailleurs, merci d'avoir résolu un bon nombre de mes problèmes pratiques via vos supers idées, on aura pas mal bricolé.

Un grand merci également à Alix et Carsten pour leurs précieux conseils concernant les échantillons et leur préparation. Merci à eux et Naoise pour avoir pris le temps de répondre à un nombre incalculable de questions concernant mes imprégnations.

Merci à Cécilia d'avoir pris de ton temps pour m'enseigner l'art de la confection des lames minces. Ça fait partie des choses que je voulais vraiment découvrir.

Merci à Bertrand et Aurélie, de l'IJPB, qui m'ont formé à l'utilisation des microscopes et m'ont guidé vers les meilleures solutions possibles pour répondre à toutes nos questions et contraintes concernant les acquisitions.

A nouveau merci à Carsten et Alix pour leur accueil à Freising, pour la confection des lames minces et pour les acquisitions en NanoSIMS. Merci à Gerti, Hans et Carmen également pour leur aide et leur soutient sur place.

Merci à Pascal d'avoir toujours pris le temps de trouver des solutions à mes problèmes qui ont presque toujours été au-delà de mes espérances. L'appui que nous a apporté l'atelier a été vraiment important.

Enfin, je garde un dernier merci pour David qui, en amont de ce projet de thèse, m'a insufflé assez de confiance en moi pour postuler à un doctorat à la suite de mon stage.

Parmi les gens que j'ai côtoyés, il y a des personnes avec qui je n'ai pas forcément travaillé de manière directe mais sans qui ma thèse n'aurait pas été ce qu'elle est.

En premier lieu il y a les gens avec qui j'ai partagé mon bureau. Merci à Camille, Marco et Nimai pour leur accueil. Vos départs ont laissé un vide (sauf Marco…).

Merci à la deuxième génération qui vous aura succédé avec Patty et Kun me laissant déjà grande détentrice des pleins pouvoirs du bureau. Patty, merci particulièrement d'avoir été une amie si bienveillante et sincère. Merci pour ton sourire qui manque à tout le labo et ton air innocent aussi (Aliia et moi on se comprend la dessus…).

La troisième génération de ce bureau aura compté parmi ses membres les plus illustres avec Xinlei, Nicolas et Marie-Liesse ainsi que notre irremplaçable Aliia. Merci à tous d'avoir été un soutient et un cadre rassurant pour chaque jour. Cela aura été un honneur d'avoir été leader suprême de notre enclave et je laisse le soin à notre secrétaire, à notre ambassadeur ainsi qu'à notre financier d'élire un successeur digne de mon charisme (ca va pas être simple…).

En dehors de mes camarades de bureau, beaucoup de personnes ont partagé du temps avec moi durant ma thèse et j'ai la conviction de m'être fait un tas d'amis. Tous, ce sont succédés, entrecroisés et il est difficile de reconstruire une image simple des relations qui nous lient: Merci à Aurore, Sixtine, Anaïs, Guillaume, Vladislav, Paul, Victor, Kevin, Eléa, Aliénor (d'avoir été une camarade de bateau si douée), Eléonore, Lisa, Juliette, Israël, Sophie, Alexandra, Justine, Cyril (IJPB) ou encore Charlène. Merci à tous nos coéquipiers du FC-Grignon et encore plus ceux de Versailles pour leur accueil dans ces moments de défoulements parfois nécessaires. A maman Patricia, merci pour ton enthousiasme, pour les longues discussions, pour ta chaleur et tes récits qui m'ont toujours complètement illuminé.

А алиушеука, merci pour ton ouverture d'esprit, pour les photos que tu as prise dans mes plus beaux moments de fatigue et de m'avoir appris le russe (principalement un grand nombre d'insultes, pour me faire plein d'amis lors de futurs voyages…), merci d'avoir pourri mon anglais de franglais et de tournures bien à nous qui font que plus personne ne nous comprends... Merci d'avoir mon humour (celui qui demande beaucoup de patience pour les autres). Merci pour tous les services rendus, etc… Après tout ce temps je pense qu'on a un peu fusionné (je me rappelle plus les % exacts sur le partage du cerveau) et que ce n'est pas passé inaperçu au labo…

A Myriam, dont le soutient s'est prolongé bien au-delà de son départ. Merci de m'avoir ouvert ta porte et pour ton oreille toujours attentive.

A Ottone (animal totem : le blaireau et sa garniture ou garnison je sais plus…), qui a été un des soutiens sans faille de ces dernières années. Merci pour avoir apporté beaucoup de rire dans cette aventure qu'on a un peu vécu ensemble.

Enfin il me reste à remercier les proches sur lesquels j'ai pu compter pendant ces années de thèse et depuis toujours. Merci à Vinciane, Warren, Thomas, Pierre et Elodie.

Merci à ma famille, mon papa, ma maman, Daniel et Suzanne qui me voient enfin finir mes études. Merci à mes 3 grands frères pour leur soutien. Je suis peut-être « la petite dernière », « la crotte », « le dernier essai », mais surtout maintenant c'est « Docteur », ça vous calmera tous…

Et finalement, Adrien, merci d'être là depuis presque 9 ans sans avoir jamais douté que j'étais capable. Merci d'être si passionné, de t'intéresser à tout, tout le temps, d'être encore plus curieux que moi, un créatif inépuisable qui m'insuffle tant de mes bonnes idées.

Table des matières

Abstract 2
Résumé 3
Remerciements 4
Table des matières 6
Liste des figures 10
Liste des Tableaux 16
Introduction générale 19
1 - Synthèse bibliographique 23
1.1. Définition des matières organiques du sol 23
1.2. Fonctions des matières organiques dans les sols 24
1.3. Stock de carbone dans les sols 24
1.4. Biodégradation des matières organiques dans les sols 25
1.4.1. Les microorganismes : acteurs principaux de la biodégradation 26
1.4.2. Distribution des microorganismes et des matières organiques dans la structure du sol 28
1.4.3. Facteurs affectant la biodégradation des matières organiques dans les sols 29
1.4.4. L'accessibilité comme facteur de biodégradation des MOS 31
1.4.5. Rôle des bactéries et des champignons dans la dégradation des MO 33
1.5. La dégradation des matières organiques au sein de la détritusphère 34
1.5.1. Hot-spots et hot-moments 34
1.5.2. Définition de la détritusphère et ses caractéristiques 36
1.5.3. Place et rôle des microorganismes au sein de la détritusphère 37
1.5.4. Impact du potentiel matriciel 38
1.6. Modèles de prédiction de la dynamique des MOS dans les sols 41
1.7. Objectifs, problématiques et démarche 42
1.8. Organisation du mémoire 45
2. Etude du volume de sol impliqué dans la biodégradation d'un substrat organique – Mises au point méthodologiques 48
2.1. Introduction 48
2.2. Comment faire varier la porosité du sol dans les cosmes ? 49
2.3. Courbes de rétention en eau des sols CONV et SCV 52
2.4. Analyse de la porosité des sols par tomographie aux rayons X 53

2.5. Suivi de minéralisation des sols CONV et SCV après apport de résidus marqués 54
2.6. Comment ajuster le potentiel matriciel des cosmes ? 56
2.7. Comment procéder à la découpe des cosmes ? 59
3. Spatial and temporal evolution of detritusphere hotspots at different soil moistures 62
3.1. Introduction 62
3.2. Materials and Methods 64
3.2.1.Experimental site and soil sampling 64
3.2.2.Crop residues 64
3.3.3. Core design 64
3.3.4. Mineralization measurements 65
3.3.5.Core slicing 66
3.3.6. Analyses of ^{13}C content of residues and soil 67
3.3.7. PLFAs extraction and analyses 67
3.3.8. ^{13}C-PLFAs analyses 68
3.3.9. Statistical analyses 68
3.4. Results 69
3.4.1. Carbon mineralization 69
3.4.2. The fate of residue C 71
3.4.3. Transfer of residue C in the soil at the millimetre scale 72
3.4.4. Distribution of total microorganisms 75
3.4.5. Distribution of residue C-degrading microorganisms after 7 days of incubation 78
3.5. Discussion 80
3.5.1. Size of the detritusphere 80
3.5.2. Microbial communities in the detritusphere 80
3.5.3. Impact of matric potential on the detritusphere 81
3.6. Conclusion 84
3.7. Supplémentary matérials 84
4. Priming effect induit par la biodégradation d'un résidu végétal à différents potentiels matriciels 95
4.1. Introduction 95
4.2. Matériels et Méthodes 100
4.2.1. Préparation des cosmes 100
4.2.2. Mesures de minéralisation à l'échelle d'un cosme de sol 101
4.2.3. Analyses statistiques 102
4.3. Résultats 102

4.3.1. Minéralisation du C issu des résidus (^{13}C) ... 102
4.3.2. Minéralisation du C du sol et priming effect ... 103
4.4. Discussion ... 107
4.4.1. Dynamique du priming effect induit par des apports de résidus complexes dans un sol à long terme ... 107
4.4.2. Effet de l'humidité du sol sur le priming effect et sa dynamique ... 108
4.4.3. Rôle des communautés microbiennes sur la dynamique à long terme du priming effect ... 109
4.5. Conclusion ... 110
5. Methods and limits in imaging microorganisms and their activities in soil micro-habitats ... 113
5.1. Introduction ... 113
5.2. Visualizing microorganisms in their habitat ... 114
5.2.1. Localizing microorganisms ... 114
5.2.2. Identifying the microorganisms ... 120
5.3. Microscale information on the activity of microorganisms ... 122
5.3.1. Visual information on the physiological state of soil microorganisms ... 122
5.3.2. Visualizing the assimilation of substrates by soil micro-organisms ... 124
5.3.3. Visualizing the enzymatic activity of soil microorganisms ... 126
5.3.4. Combinatorial approaches ... 128
5.4. Characteristics of the microorganisms' microhabitat ... 129
5.4.1. Physical characteristics of the habitat ... 129
5.4.2. Localisation of organic matter in soil ... 131
5.4.3. Other chemical characteristics of the habitats ... 137
5.5. Discussion ... 140
5.5.1. Samples preparation methods ... 141
5.5.2. Image processing ... 143
5.5.3. Image representativeness ... 144
5.5.4. Combination of observation methods ... 144
5.5.5. Perspectives ... 146
5.6. Conclusion ... 148
6. Evolution spatio-temporelle des microorganismes totaux et actifs à une échelle µm à mm dans la détritusphère ... 151
6.1. Introduction ... 151
6.2. Matériels et Méthodes ... 154
6.2.1. Préparation des cosmes ... 154
6.2.2. Préparation des lames minces ... 154

6.2.3. Distribution spatio-temporelle des microorganismes totaux 156
6.2.4. Distribution spatio temporelle des microorganismes dégradants (nanoSIMS) 172
6.2.5. Analyses statistiques 176
6.3. Résultats 177
6.3.1. Validation de la méthode de détection 177
6.3.2. Distribution spatio-temporelle des microorganismes totaux selon le potentiel matriciel à échelle millimétrique 177
6.3.3. Distribution spatio-temporelle des microorganismes totaux à une échelle µm 183
6.3.4. Distribution spatio-temporelle des microorganismes actifs à une échelle µm 189
6.4 Discussion 194
6.4.1. Limites méthodologiques 194
6.4.2. Distribution spatiale des microorganismes totaux à une échelle mm 197
6.4.3. Distribution spatiale des microorganismes totaux à une échelle µm 198
6.4.4. Distribution spatiale des microorganismes dégradants à une échelle µm 200
6.5. Conclusion 200
6.6. Supplemantary materials 201
7. Discussion générale 208
7.1. Objectifs et démarche 208
7.2. Quel est l'impact du potentiel matriciel et en particulier d'une condition de sol sec sur la biodégradation de résidus végétaux localisés ? 209
7.3. Quels volumes de sol et quelles communautés microbiennes sont impliqués dans la détritusphère et comment sont-ils modulés par la teneur en eau ? 209
7.4. Quel est l'impact du potentiel matriciel sur le priming effect après apport de résidus végétaux au sol ? 211
7.5. Quel est l'impact du potentiel matriciel sur la répartition des microorganismes dans le sol ? . 211
7.6. Quels sont les sites de biodégradation de la matière organique dans le sol ? 212
7.7. Limites et perspectives 213
8. Conclusion 217
Références 219

Liste des figures

Figure 1 - Synthèse des méthodes de suivi des communautés microbiennes des sols. D'après Thies (2015) _____ 27
Figure 2 – Représentation du continuum de biotransformation des matières organiques du sol. La biodégradation est continue depuis les résidus animaux et végétaux jusqu'aux molécules les plus simples et leur minéralisation par les microorganismes du sol. Tout au long de ces étapes des mécanismes de stabilisation et déstabilisation peuvent avoir lieu. D'après Basile-Doelsch et al. (2020). _____ 31
Figure 3 - Effet du potentiel matriciel d'un sol sur l'accessibilité et l'activité des microorganismes. D'après Moyano et al. (2013) _____ 33
Figure 4 - Echelles spatiales et temporelles caractérisant les hot-moments et les hot-spots dans le sol. D'après Kuzyakov et Blagodatskaya (2015)_____ 35
Figure 5 - Schéma récapitulatif des différentes mesures effectuées sur les cosmes à échelle centimétrique, à échelle millimétrique et micrométrique _____ 43
Figure 6 – Construction d'un cosme (a). Application de la couche de résidus (b). Cosme fini (57 mm de diamètre pour 40 mm de hauteur) (c). Cosme fini (20 mm de diamètre pour 40 mm de hauteur) (d). _____ 49
Figure 7 - Vue aérienne du site expérimental de La Cage avec blocs de prélèvement foncés _____ 50
Figure 8 - Profils des teneurs en carbone, azote, rapport C/N et biomasse microbienne des sols de la Cage sous trois des différents systèmes de culture : conventionnel (en bleu), en agriculture de conservation (SCV en rouge) et biologique (en vert). D'après Juarez (2013). _____ 51
Figure 9 - Courbes de rétention ω à gauche et θ à droite (en eau pour le sol en pratique conventionnelle (CONV-violet) et en agriculture de conservation (SCV -vert). Les barres correspondent à l'écart type de 3 réplicats. _____ 52
Figure 10 - Images obtenues d'un cosme en tomographie des rayons X en 3D (à gauche) et selon une coupe longitudinale (à droite). Les zones sombres correspondent aux zones de vides (pores) et les zones grises aux agrégats de sol. La bande noire au centre des images correspond à la couche de résidus apportée (flèches rouges). _____ 53
Figure 11 - Courbes du volume de pores cumulé occupé dans le sol selon leur taille sous pratique conventionnelle (violet) et en agriculture de conservation (SCV vert). Les barres correspondent à l'écart type de 3 réplicats. _____ 54
Figure 12 - Cinétiques de minéralisation du carbone total du sol en système conventionnel (CONV-traits pleins) et en agriculture de conservation (SCV-trait pointillés) amendé en résidus, pendant 45 jours. Les barres correspondent à l'écart type de 3 réplicats. _____ 55
Figure 13 - Cinétiques de minéralisation du carbone issu des résidus (13C-CO2) dans le sol en système conventionnel (CONV-traits pleins) et agriculture de conservation (SCV-trait pointillés) pendant 45 jours. Les barres correspondent à l'écart type des réplicats. _____ 55
Figure 14 - Cinétiques de minéralisation du carbone du sol en système conventionnel (CONV-traits pleins) et agriculture de conservation (SCV-trait pointillés) amendé en résidus pendant 45 jours. Les barres correspondent à l'écart type des 3 réplicats._____ 56
Figure 15 - Schéma du fonctionnement des tables de succion _____ 57
Figure 16 - Etat du demi-cosme après mise à l'équilibre des agrégats à pF1.5 puis compaction. On constate les pertes d'eau et de sol par-dessous et la mauvaise tenue des agrégats et de leur structure. 58

Figure 17 - Etat d'un demi-cosme après compaction puis mise à l'équilibre à pF1,5 par vaporisation. On constate la formation d'une croute en surface et la mauvaise tenue des agrégats de surface et de leur structure. 59
Figure 18 - Dispositif de découpe millimétrique des cosmes avec les cales de 2 mm visibles sur un modèle transparent. 60
Figure 19 - Kinetics of total carbon mineralization of control soil and soil amended with residues over 45 days. The bars correspond to the standard deviation of the 3 replicates and the letters to the results of the statistical tests (Tukey test) between the 3 pFs for each date and each treatment (controls and amended cores treated separately). 70
Figure 20 - Kinetics of residues carbon mineralization: cumulative mineralization (a) and daily mineralization (b). In both cases, the bars correspond to the standard deviation of the replicates and the letters to the results of the statistical tests (Dunn test (a) and Tukey test (b)) between the 3 pFs for each date. 71
Figure 21 - ^{13}C distribution (% of the added ^{13}C) in the mineralized, soil and residues fractions after 3, 7, 15 and 45 days of incubation for the 3 matric potentials. 72
Figure 22 - ^{13}C content from residues in different soil slices located at increasing distances from the residues layer (0-2, 2-4, 4-6 and 12-14 mm) after 3, 7, 15 and 45 days of incubation at pF1.5 (a), pF2.5 (b) and pF3.5 (c). The bars correspond to the standard deviation of the replicates and the letters to the results of the statistical tests (Dunn test) between slices 0-2, 2-4, 4-6 and 12-14 mm (all dates combined) 74
Figure 23 - Principal Component Analysis (PCA) of total microbial PLFAs corresponding to Gram-negative bacteria (G.neg), Gram-positive bacteria (G.pos) and fungi after 3 days (a, c) and 45 days (b, d) of incubation according to the 3 different matric potentials (a, b) and according to different slices of soil located at increasing distances from the residues (c, d). 77
Figure 24 - ^{13}C-PLFA content according to different soil slices located at increasing distances from the residues (0-2, 2-4, 4-6 and 12-14 mm) at pF1.5 (blue) and 3.5 (red) after 7 days of incubation. The letters correspond to the results of the statistical tests (Dunn test). 79
Figure 25 - Principal Component Analysis (PCA) of total PLFA and $^{13}PLFA$ according to matric potential after 7 days of incubation 79
Figure 26 - Distribution of residues-C in different spatial compartments after incubation of maize inflorescence for 7 days at pF1.5 (on top) and 3.5 (on bottom), expressed in percentages of initial ^{13}C 83
Figure 27 - Water retention curve of the studied soil (n=3). (pF = - log h where h is the pressure applied in water cm). 84
Figure 28 - Correlations between 13C in the residue layer and mineralized 13C (a), and between 13C in the soil layer and mineralized 13C (b). 85
Figure 29 - Total microbial PLFA - all treatments combined - according to the different sampling dates (a), the different pFs (b) and the distances from residues (c). Black diamonds correspond to the means and the letters to the results of the statistical tests (Dunn test). 86
Figure 30 - Evolution of the fungi/bacteria ratios in different soil slices located at increasing distances from the residue layer (0-2, 2-4, 4-6 and 12-14 mm) after 3, 7, 15 and 45 days of incubation at pF1.5 (a), pF2.5 (b) and pF3.5 (c). The bars correspond to the standard deviation of the replicates and the letters to the results of the statistical tests (Dunn test) between slices 0-2, 2-4, 4-6 and 12-14 mm (all dates combined). 87
Figure 31 - Fungi/bacteria ratios, all treatments combined, according to the different sampling dates (a), the different pFs (b) and the distances from residues (c). Black diamonds correspond to the means and the letters to the results of the statistical tests (Dunn test). 88

Figure 32 - Bacterial (a) and fungal (b) PLFA contents in the 2 first mm of soil, all matric potentials combined, and according to the different sampling dates. Black diamonds correspond to the means and the letters to the results of the statistical tests (Dunn test). _____ 89
Figure 33 - Bacterial (a) and fungal (b) 13C-PLFA contents in different soil slices located at increasing distances from the residues (0-2, 2-4, 4-6 and 12-14 mm) at pF 1.5 (blue) and 3.5 (red) after 7 days of incubation. The letters correspond to the results of the statistical tests (Dunn test).____ 90
Figure 34 - Percentage of bacterial (a) and fungal (b) 13C-PLFA contents expressed in % of total PLFA in different soil slices located at increasing distances from the residues (0-2, 2-4, 4-6 and 12-14 mm) at pF 1.5 (blue) and 3.5 (red) after 7 days of incubation. The letters correspond to the results of the statistical tests (Dunn test). _____ 91
Figure 35 - Principal Component Analysis (PCA) of total PLFA and 13C-PLFA according to distances from the residues layer _____ 92
Figure 36 - Cinétiques de minéralisation du carbone issu des résidus (^{13}C-CO2) jusqu'à 601 jours. Les barres correspondent à l'écart type des réplicats et les lettres aux résultats des tests statistiques (Dunn test).____ 103
Figure 37 - Cinétiques de minéralisation du carbone du sol témoin et amendé en résidus sur 601 jours. Les barres correspondent à l'écart type des 3 réplicats et les lettres aux résultats des tests statistiques (Tukey test) entre les 3 pF (cosmes contrôles et avec résidus traités séparément).____ 104
Figure 38 - Cinétiques du priming effect cumulé (a) et du priming effect relatif au C du sol minéralisé (b) sur 601 jours. Dans le cas du priming effect, les barres correspondent à la déviation standard._ 106
Figure 39. Example of composed image coming from different thin sections stained with CalcoFluor White and observed with an epifluorescence microscope. The yellow arrow indicates a not fully focused bacteria but still identified by the image post processing, the red arrow indicate the presence of auto fluorescence and the purple arrow indicate a too tiny element to be clearly identified even with the post processing. Images: Nunan et al. (2001).____ 116
Figure 40 - Microorganisms observed, with Low Temperature SEM, inside (a) and at the surface (b) of micro-aggregates of soil. Images: Chenu et al. (2001). Observations of microorganisms, with TEM, in a forest (c) and cultivated (d) soil after inclusion in a resin and preparation of ultrathin sections (µ= microorganisms, c= clay). Images: Chenu and Plante (2006). _____ 119
Figure 41 - Microorganisms observation (E. coli strain, targeted by GAM42a probe and AK199 strain, targeted by ROS537 probe) after staining with Gold-FISH technique and using probes GAM42a (A), ROS537 (B) and NONEUB (as negative control probe) (C). On the top: observation of the Gold-FISH signal; on the bottom: observation with DAPI. White arrows: targeted cells; pink arrows: non-targeted cells. Scale bar : 20µm. Images: Schmidt et al. (2012). _____ 122
Figure 42 - Section of a *Pseudomonas fluorescens* colony in a soil after addition of ^{15}N. The cells that have assimilated the ^{15}N are visualized in red. (A) surimposed NanoSIMS images (in blue:$^{28}Si^-$, in green: $^{12}C^{14}N^-$ and in red: Ratio $^{15}/^{14}$N). (B) Mosaic of surimposed NanoSIMS images following the same caption. Red arrows indicate *Pseudomonas fluorescens* labelled in soil. Images: Herrmann et al. (2007b).____ 126
Figure 43 - Zymograms showing the activity of phosphatase enzyme around a root system in an amended soil (a, b, c, d) and control soil (e, f, g, h) with (A) acid phosphatase enzyme and (B) alkaline phosphatase with (C) as calibration membranes. Each image measure 12 x 11 cm. Images : Spohn et al. (2013) _____ 128
Figure 44 - Images obtained by X-ray tomography of a cement material (b) in which are segmented 3 solid phases: aggregates (c), cement hydrates (d) and un-hydrated particles (e) through the histogram of the image (a), the thresholds or boundaries of which are placed at the weakest points of the phase overlap. Images modified from Landis and Keane, (2010)_____ 131

Figure 45 - Spatial distribution of stained OM with osmium inside a section of aggregate (A). Particulate OM (POM) show the osmium strong staining in red (B) and the less important ones in green or yellow at the pore surface (C) or following cracks (D). Images: Peth et al. (2014). 133
Figure 46 - Observations of organic carbon from a kaolin oxisoil by NEXAFS (resolution = 50nm). (A) Optical density map of total carbon: light zones indicate the presence of carbon; white squares indicate interest zones on which the NEXAFS map had been done (B) and (C). Scale bars: 1 µm. Images: Singh and Gräfe (2010) from Kinyangi et al. (2006) 134
Figure 47 - Carbon concentration forecast and their repartition in a soil observed with hyperspectral VNIR camera and 3 linear regression models (narrow band index, partial least square regression (PLSR) and support vector regression (SVR)) – Dimension are in cm. Images: Steffens and Buddenbaum, (2013). 135
Figure 48 - Chemical map done with SEM-EDX (a) combined with X-R CT allowing getting a 3D reconstruction of soil chemical composition using a statistical approach with a regression tree and a krigeage regression tree (b). Each cube measure approximatively 1 x 1 x 1.3 cm. Images from: Hapca et al. (2015) 137
Figure 49 - Images taken over time with the use a chemical probe of the evolution of O2 induced by the respiration of lupine roots. Images from Rudolph et al. (2012) 138
Figure 50 - Images realised with neutron radiography showing the distribution of water in a soil containing a layer of sand and inside it is possible to see lupine roots. Each image measures 10 x 10 cm approximatively. Images from: Rudolph et al. (2012). 139
Figure 51 - Ensemble des étapes de préparation des lames minces: 1 - fixation, 2 - marquage, 3 - déshydratation, 4 - imprégnation, 5 - sciage des cosmes, 6 - amincissement et 7 – polissage. 155
Figure 52 - Organisation des cosmes une fois l'imprégnation terminée et avant la confection des lames minces selon des coupes longitudinales (a) et transversales (b). Lame mince finie avec bord de la lame en verre en pointillés (c). 156
Figure 53 - Résultats du prétraitement des images : images obtenues en fin d'acquisition de la mosaïque totale de 2 par 14 mm (a) et d'une sous partie de la mosaïque (zoom) (c) où l'on observe des zones doubles sur le bord des images (flèches rouges) et après correction (b et d). Après correction de la mosaïque, le réalignement génère des bords noirs (flèches jaunes) (b). 157
Figure 54 - Schéma général des deux étapes principales du traitement des images. A – détection des zones non colonisées par les microrganismes. B – détection des microorganismes. Sous images de 2 mm par 2 mm. 159
Figure 55 - Descriptif général des images avec le type d'objets et artéfacts généralement observés. Sol avec microorganismes (flèches jaunes) et artéfacts (flèches rouges) (a). Sous images de : pore « clair » avec problème de décollement de résine (b), pore « sombre » (c), zone floue (d) et minéral de taille importante (e). 160
Figure 56 - Schématisation de l'ensemble des opérations ayant permis de sélectionner les zones correspondant aux pores et aux zones fortement homogènes. Images de 4 mm par 2 mm. 163
Figure 57 - Exemples d'images traitées avec la méthode développée pour éliminer les zones claires et homogènes (cerclées de jaune). 164
Figure 58 - Schématisation de l'ensemble des opérations ayant permis de sélectionner les objets correspondants aux microorganismes sur la zone à étudier. Images de 4 mm par 2 mm. 166
Figure 59 - Exemple d'image traitée permettant de détecter les microorganismes (cerclés de rouge). 167
Figure 60 – Image binarisée des pores obtenus par la méthode décrite dans la figure 56 (a). Même image obtenue après soustraction des pores inférieurs à 0.05 mm² (b). Image de la carte des distances créée à l'aide de l'image b (c). Les pores apparaissent en blanc et les niveaux de gris correspondent à

la distance d'un pixel donné au pore le plus proche (plus un pixel est clair, plus il est proche d'un pore et inversement). Images de 4 mm par 2 mm. _____ 170
Figure 61 - Superposition des colonies sur les cartes des distances aux macropores._____ 171
Figure 62 - Représentation du traitement permettant de corriger l'effet de charge constaté sur certaines images. (a) Image $^{12}C^{14}N$ (avec $^{12}C^{14}N$ en gris et partie minérale sans $^{12}C^{14}N$ en noir). (b) binarisation de l'image avec séparation des parties organiques en gris et minérales en rouge. (c) délimitation des zones minérales (en noir). (d) Image du ratio $^{13}C/^{12}C$ avec effet de charge visible autour de l'emplacement des minéraux (flèches rouges). (e) superposition avec les zones détectées par la binarisation préalable. (f) soustraction des zones minérales et élimination de l'effet de charge. Images de 30 µm par 30 µm. _____ 174
Figure 63 – Zones organiques issues de la binarisation de l'image $^{12}C^{14}N$ (a). Zones présentant un marquage $^{13}C/^{12}C$ supérieur à 0.12 (b) et zones communes aux deux ensembles représentant les zones où des microorganismes actifs sont détectés (c). Images de 30 µm par 30 µm. _____ 175
Figure 64 - images ^{16}O (a), $^{12}C^{14}N$ (b) et $^{56}Fe^{16}O$ (c) à l'origine de l'image composite d. Images de 30 µm par 30 µm._____ 175
Figure 65 - 3 images composites des images ^{16}O (en bleu), $^{12}C^{14}N$ (en vert) et $^{56}Fe^{16}O$ (en rouge) acquises successivement par nanoSIMS (a, b et c) et assemblées grâce à MosaicJ (d). Les images a, b et c mesurent 30 µm par 30 µm et l'image d 30 µm par 90 µm._____ 176
Figure 66 – Nombre de colonies tous facteurs confondus en fonction des différentes dates de prélèvement (a), des différents pF (toutes dates et distances confondues) (b) et des couches de sol situées à des distances croissantes du résidu (0-2 mm; 2-4 mm; 4-6 mm et 12-14 mm) (toutes dates et pF confondus) (c). Les losanges noirs correspondent aux moyennes et les lettres aux résultats des tests statistiques (Dunn test)._____ 178
Figure 67 - Nombre de colonies observées en microscopie à fluorescence à pF1,5 (a), pF2,5 (b) et pF3,5 (c) après 45 jours d'incubation. Les losanges noirs correspondent aux moyennes et les lettres aux résultats des tests statistiques (Dunn test). _____ 179
Figure 68 – Nombre des colonies observées en microscopie à fluorescence en fonction du potentiel matriciel et du temps d'incubation (toutes distances confondues). Les points rouges correspondent aux moyennes et les lettres correspondent aux résultats des tests statistiques (Dunn test)._____ 180
Figure 69 - Taille moyenne des colonies tous facteurs confondus en fonction du temps (a), du pF (toutes dates et distances confondues) (b) et de la distance aux résidus (0-2 mm; 2-4 mm; 4-6 mm et 12-14 mm) (toutes dates et pF confondus) (c). Les losanges noirs correspondent aux moyennes et les lettres aux résultats des tests statistiques (Dunn test)._____ 181
Figure 70 – Taille moyenne des colonies observées à pF1,5 (a), pF2,5 (b) et pF3,5 (c) après 45 jours d'incubation. Les losanges noirs correspondent aux moyennes et les lettres aux résultats des tests statistiques (Dunn test). Enfin, il semblerait que, selon le pF, la taille des colonies augmente avec des différences significatives entre les jours 3 et 45 pour les pF1,5 et pF2,5 (figure 71)._____ 182
Figure 71 – Taille moyenne des colonies observées en fonction du potentiel matriciel et du temps d'incubation (toutes distances confondues). Les points rouges correspondent aux moyennes et les lettres aux résultats des tests statistiques (Dunn test)._____ 183
Figure 72 - Indice d'agrégation selon le rayon d'observation. Les barres correspondent à l'écart type et les lettres correspondent aux résultats des tests statistiques (Dunn test). _____ 184
Figure 73 - Indice d'agrégation pour un rayon de 50 µm en fonction de la distance aux résidus (0-2 mm, 2-4 mm, 4-6 mm, 12-14mm) à pF1,5 (a) et pF3,5 (b), du temps d'incubation (3 et 45 jours) à pF1,5 (c) et pF3,5 (d) et du potentiel matriciel tous facteurs confondus (pF1,5 et pF3,5) (d). Les barres correspondent à l'écart type et les lettres correspondent aux résultats des tests statistiques (Dunn test). _____ 185

Figure 74 - Histogramme de répartition des colonies pour les pF1.5 et pF3,5 pour des classes de distribution de 10 µm. Les barres correspondent à l'écart type et les lettres aux tests statistiques (Dunn test). 186
Figure 75 - Histogramme de répartition des colonies pour les pF1,5 et pF3,5 pour des classes de distribution de 10 µm. Les barres correspondent à l'écart type et les lettres aux tests statistiques entre les pF1,5 et pF3,5 pour chaque distance aux pores (Dunn test). 187
Figure 76 - Histogramme de répartition des colonies en fonction de la distance aux résidus (0-2mm, 2-4 mm, 4-6 mm et 12-14 mm) pour des classes de distribution de 10 µm. Les barres correspondent à l'écart type et les lettres aux tests statistiques entre les distances aux résidus 0-2 mm, 2-4 mm, 4-6 mm et 12-14 mm pour chaque distance aux pores (Dunn test). 188
Figure 77 - Histogramme de répartition des colonies après 3 et 45 jours d'incubation pour des classes de distribution de 10 µm à pF1,5 (a) et à pF3,5 (b). Les barres correspondent à l'écart type et les lettres aux tests statistiques entre les jours 3 et 45 pour chaque distance aux pores (Dunn test). 189
Figure 78 - Mosaïques d'images acquises par NanoSIMS des échantillons à pF1,5 au contact du résidu après 7 jours d'incubation. Images composites des éléments $^{12}C^{14}N$, $^{56}Fe^{16}O$ et ^{16}O (a, e, i). Projection des zones riches en $^{12}C^{14}N$ sur les images du Ratio $^{13}C/^{12}C$ (b, f, j). Projection des zones marquées ^{13}C à hauteur de 1.2% sur les images du Ratio $^{13}C/^{12}C$ (c, g, k). Projection des zones comprenant à la fois des zones riches en $^{12}C^{14}N$ et marquées ^{13}C à hauteur de 1.2% sur les images du ratio $^{13}C/^{12}C$ (d, h, l). 192
Figure 79 - Images acquises par NanoSIMS des échantillons à pF1,5 au contact du résidu après 45 jours d'incubation. Images composites des éléments $^{12}C^{14}N$, $^{56}Fe^{16}O$ et ^{16}O (a,e). Projection des zones riches en $^{12}C^{14}N$ sur les images du Ratio $^{13}C/^{12}C$ (b, f). Projection des zones marquées ^{13}C à hauteur de 1.2% sur les images du Ratio $^{13}C/^{12}C$ (c, g). Projection des zones comprenant à la fois des zones riches en $^{12}C^{14}N$ et marquées ^{13}C à hauteur de 1.2% sur les images du ratio $^{13}C/^{12}C$ (d, h). 193
Figure 80 - Images acquises par NanoSIMS des échantillons à pF3,5 au contact du résidu après 45 jours d'incubation. Images composites des éléments $^{12}C^{14}N$, $^{56}Fe^{16}O$ et ^{16}O (a,e). Projection des zones riches en $^{12}C^{14}N$ sur les images du Ratio $^{13}C/^{12}C$ (b, f). Projection des zones marquées ^{13}C à hauteur de 1.2% sur les images du Ratio $^{13}C/^{12}C$ (c, g). Projection des zones comprenant à la fois des zones riches en $^{12}C^{14}N$ et marquées ^{13}C à hauteur de 1.2% sur les images du ratio $^{13}C/^{12}C$ (d, h). 194
Figure 81 - Exemple d'histogramme de l'une de nos images (a) et détermination du seuil de binarisation du même histogramme par la méthode du triangle (b). A partir du nombre maximal (A) et minimal (B) de pixels permettant de définir la distance maximale d. 201
Figure 82 - Exemple d'histogramme de l'une de nos images suite à l'application d'un flou puis d'un traitement Edge detector (a). Détermination du seuil de binarisation du même histogramme par la méthode Huang (b). qui définit un seuil en fonction de la similarité des attributs. 201
Figure 83 - Images d'une même zone du sol observée en microscopie à épi-fluorescence en x10 (a), x40 (b) et x100 (c). Les rectangles rouges (a et b) correspondent à la zone de grossissement de l'image et les flèches vertes à une colonie. 204
Figure 84 - Observations réalisées sur les mêmes zones à la loupe binoculaire (à gauche) puis en épi-fluorescence x100 (à droite). Image du sol, de colonies de microorganismes (flèches vertes) (a) et d'un hyphe de champignon (flèches jaunes) (b). 205
Figure 85 - Fréquence de répartition des pores et minéraux selon leur taille (pour des classes de 500 µm²) 206

Liste des Tableaux

Tableau 1 - Comparaison des différentes propriétés intrinsèques des bactéries et des champignons. D'après Coppens et al. 2006; Ekschmitt et al. 2008; Kuzyakov et Blagodatskaya, 2015 et Coleman et al. 2018 _____ 34
Table 2. Size and microbial community evolution of detritusphere according to various incubation set-ups._____ 93
Table 3 - Observation methods to localize microorganisms in soil samples _____ 115
Table 4 - Staining and imagery methods to localize microorganisms in soil._____ 117
Table 5 - . Imagery methods to characterise the activity of microorganisms in soil. _____ 124
Table 6 - Imagery methods to characterise soil's habitats_____ 132
Table 7 - Other methods to characterise chemical characteristics of soil _____ 140
Tableau 8 - Récapitulatif des images réalisées en nanoSIMS _____ 173
Tableau 9 - Récapitulatif des images réalisées en nanoSIMS avec mention du marquage observé._ 190
Tableau 10 - Comparaison des caractéristiques des images obtenues selon différents systèmes d'acquisition_____ 202
Tableau 11 - Récapitulatif des principaux résultats obtenus sur l'ensemble des observations en fonction du potentiel matriciel, de la distance aux résidus apportés et du temps d'incubation. ____ 213

The data presented in this manuscript are available upon request.

Introduction générale

General introduction

Introduction générale

Le sol est l'un des supports majeurs de notre environnement et de la biosphère. Le sol assure de nombreuses fonctions et rend des services écosystémiques. Malgré cela, les sols sont soumis à de nombreuses menaces et se renouvellent extrêmement lentement au regard de leur dégradation. Le sol n'est plus aujourd'hui considéré comme une ressource illimitée mais bien comme une richesse qui s'épuise à travers la surexploitation (via un certain nombre de pratiques entrainant la perte des matières organiques, la compaction, l'asphyxie, l'érosion ou encore la contamination des sols) et ce, tout en sachant qu'il sera essentiel pour répondre aux problématiques d'accroissement de la population terrestre. En effet, l'un des objectifs auquel l'humanité devra faire face d'ici 2050 sera de subvenir aux besoins de 9 milliards d'êtres humains et cela aura nécessairement un impact sur notre utilisation du sol. De plus, les terres cultivables ne représentent qu'une faible fraction de la surface totale des sols. Les sols de montagnes, les sols arides, trop froids, contaminés, pauvres en matières organiques et nutriments, trop humides ne permettent bien souvent pas leur mise en culture et si les terres émergées représentent 13,5 milliards d'hectares, seuls 3 milliards peuvent être utilisés à ces fins. La bonne compréhension, et de ce fait la meilleure gestion des sols, est donc un enjeu majeur de la durabilité de l'agriculture et cette prise en considération est indispensable au vu des défis que présente le XXIe siècle.

L'ensemble des matières organiques du sol représente le plus grand réservoir de carbone de la biosphère continentale (on estime que le stock de carbone des matières organiques du sol est deux fois plus important que celui contenu dans l'atmosphère) et à ce titre, les possibilités de stockage mais aussi de relargage du carbone sont énormes (Stockmann et al., 2013; Lal, 2019). En effet, leur dégradation par les organismes vivants du sol affecte les bilans de gaz à effet de serre à travers leur minéralisation en CO_2, CH_4 ou encore en N_2O, ces gaz à effet de serre contribuant en grande partie au réchauffement climatique.

Si l'utilisation croissante des énergies fossiles et la production de ciment sont les causes principales des émissions de CO_2 (plus de 7 GtC par an en 2000 (Lal, 2008; IPCC, 2013), 9.5 GtC par an en 2011 (IPCC, 2013) et jusqu'à 10 GtC par an en 2018 (Friedlingstein et al., 2019), une grande partie est également imputable aux modes d'occupation des sols et à leurs changements d'utilisation. Ces transferts de carbone vers le pool atmosphérique sont estimés à 11.5 GtC par an (Friedlingstein et al., 2019). La partie imputable aux conversions des sol en

surfaces agricoles serait estimée entre 0,4 et 2,2 GtC par an dans les années 80 puis plutôt entre 0,8 et 2,2 GtC par an en 2018 (IPCC, 2013; Friedlingstein et al., 2019) Historiquement la part de carbone organique des sols perdue suite à ces conversions est estimée à 135 GtC dont 80 GtC entre 1960 et 2017 (Lal, 2019).

Les prédictions concernant les dynamiques et le devenir de ces pools de carbone sont évalués à l'aide de modèles prédictifs « compartimentaux » correspondant à un agencement d'unités simples d'intérêt fonctionnel reliées par des cinétiques d'ordre 1 (Six et al., 2002; Manzoni et Porporato, 2009) comme Century ou RothC. Les temps moyens de résidence du carbone associés aux différents réservoirs y représentent les phénomènes bio-physico-chimiques qui impactent le devenir du carbone. Les rôles de la biomasse microbienne et des activités enzymatiques dans les processus de décomposition sont souvent négligés au profit d'une prise en compte de la qualité chimique du substrat uniquement (contenu en C, N et constituants végétaux). Ces modèles décrivent la biogéochimie du sol principalement à l'échelle de la parcelle. Leur formulation mathématique ne dérive pas de contraintes biochimiques et physiques à des échelles où les sols présentent justement des hétérogénéités à l'origine des modulations de la biodégradation. Or, c'est à cette échelle que la biodégradation, la minéralisation et la stabilisation du carbone ont lieu. Ainsi, l'importance relative des régulations biologiques face aux régulations abiotiques n'est pas pleinement prise en compte à l'échelle des habitats microbiens. C'est pourquoi une vision dite « mécaniste » intégrant l'hétérogénéité spatiale à ces échelles sont aujourd'hui préconisés (Manzoni and Porporato, 2009; Lehmann and Kleber, 2015).

Le sol est un milieu hétérogène qu'il n'est pas simple de décrire. La description de la biodégradation des matières organiques du sol est donc un défi difficile à relever. Les matières organiques du sol présentent une grande hétérogénéité spatiale (Chenu et Plante, 2006; Peth et al., 2014) et les microorganismes qui en sont les décomposeurs occupent une très petite fraction du sol avec une hétérogénéité spatiale également très importante (Ranjard et Richaume, 2001). Microorganismes et matières organiques n'étant pas forcément co-localisés, l'accessibilité joue un rôle clef dans la biodégradation (Balesdent et al., 2000; Dungait et al., 2012). Cette accessibilité est elle-même contrôlée par différents facteurs : les caractéristiques indigènes du sol, et notamment la porosité et son organisation qui modulent les processus de transport de gaz et notamment d'oxygène et de liquides et des facteurs

abiotiques tels que la teneur en eau. Bien que ces différents facteurs aient été identifiés, leurs impacts sont encore aujourd'hui assez mal quantifiés, ce qui rend difficile leur hiérarchisation. C'est dans ce contexte que s'articule ce sujet de thèse dont l'objectif est d'évaluer l'impact de facteurs de régulation abiotiques tels que la porosité, la teneur en eau ou la localisation des microorganismes et des substrats dans le sol sur la minéralisation du carbone et ceci à l'échelle de l'habitat microbien.

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

Chapter 1: Bibliographic synthesis

1 - Synthèse bibliographique

1.1. Définition des matières organiques du sol

Les matières organiques des sols (MOS) regroupent l'ensemble des constituants organiques, vivants et morts, présents dans le sol, d'origine végétale, animale ou microbienne, transformés ou non (Sollins et al., 1996).

Le sol étant majoritairement minéral, les matières organiques qui le composent n'en représentent qu'un faible pourcentage. Si les matières organiques (MO) sont principalement composées de carbone (environ 50%), elles contiennent également d'autres éléments comme de l'hydrogène, de l'oxygène, de l'azote, du soufre et du phosphore.

Elles se répartissent en différents groupes :

- Les matières organiques vivantes animales, végétales et microbiennes qui représentent la totalité de la biomasse en activité ;
- Les matières organiques fraîches composées de débris de végétaux, animaux et microbiens (déjection, cadavres, exsudats) qui sont facilement décomposables ;
- Les matières de l'humus qui correspondent à des composés organiques stabilisés suite à la dégradation de matières organiques fraiches et qui représentent 70 à 90% des matières organiques du sol.

Il semble aujourd'hui admis que le concept de substances humiques souvent développé comme étant un ensemble de composés carbonés aux structures hétérogènes, hautement polymérisés et résistants à la dégradation (Piccolo, 1996) n'ait pas vraiment de réalité biologique. C'est pourquoi à l'heure actuelle, cette fraction de la matière organique est plutôt décrite comme une association supramoléculaire d'unités de plus petites tailles stabilisées par des interactions hydrophobes (Piccolo, 2001).
Les temps de résidence de ces fractions peuvent varier de quelques mois à quelques années pour les matières organiques vivantes ou simples (sucres simples, acides aminés), de 2 à 30 ans pour les matières organiques facilement décomposables et jusqu'à 1000 ans pour les matières organiques stables (Piccolo, 1996; Von Lützow et al., 2008).

1.2. Fonctions des matières organiques dans les sols

Les matières organiques assurent de nombreuses fonctions dans les sols (Ekschmitt et al., 2005). En effet, grâce à leurs propriétés, les matières organiques :

- participent à l'agrégation et la structuration du sol en jouant un rôle dans la cohésion entre les particules minérales via des ciments organiques (Ranjard et Richaume, 2001) permettant l'aération du sol, le développement racinaire ainsi qu'une meilleure résistance aux agressions extérieures comme la pluie ou le tassement (Tisdall et al., 1978; Balesdent et al., 2000).
- participent à une bonne rétention d'eau dans les sols nécessaire à l'alimentation hydrique des végétaux
- influent sur la capacité d'échange cationique (CEC) et participent à la rétention des ions mais également des polluants organiques et minéraux.
- via leur minéralisation, entrainent la libération de nutriments utiles au développement des organismes et à la croissance des végétaux
- favorisent la biodiversité directement par apport de carbone, de nutriments et d'énergie et indirectement en modifiant les caractéristiques physico-chimiques du sol

Elles contribuent ainsi à de nombreux services tels que la fertilité chimique et physique, la qualité des eaux, la qualité de l'air et la régulation du climat (stockage de C). Mais elles peuvent également avoir des impacts négatifs via des émissions de gaz à effet de serre : CO_2, N_2O ou CH_4 lorsqu'elles sont minéralisées.

1.3. Stock de carbone dans les sols

Bien que ne représentant que quelques pourcents dans les sols, les matières organiques sont présentes en grande quantité dans les sols qui représentent l'un des plus grands réservoirs de carbone de la biosphère continentale (entre 1500 et 2400 Gt (Friedlingstein et al., 2019)) avec 2344 Gt de carbone organique contenus dans les 3 premiers mètres du sol (Stockmann et al., 2013). Le sol est donc à la fois un puit de carbone pouvant piéger le carbone issu des apports mais peut également être source d'émission sous forme de gaz (CO_2, CH_4…) dans l'atmosphère. Le stock de C dans les sols est deux fois supérieur à celui de l'atmosphère (860 Gt) (Friedlingstein et al., 2019) et plus de quatre fois plus important que le carbone biotique terrestre (560 Gt) (Stockmann et al., 2013).

Les stocks de carbone dans les sols résultent d'un équilibre entre les entrées et les sorties de carbone du système « sol ». Les principales entrées de carbone vers le sol proviennent de la biosphère continentale et en grande majorité des végétaux qui colonisent le sol. Pour leur croissance, les végétaux fixent le carbone atmosphérique grâce à la photosynthèse. Le passage du premier réservoir au réservoir C du sol se fait en plusieurs étapes (Baldock et Skjemstad, 2000) :

-La déposition : comprenant les exsudats et les restes végétaux qui, une fois mort et sans exportation, reposent sur (partie aériennes) ou dans (racines et exsudats) le sol.
-L'altération : les résidus organiques sont incorporés puis dégradés par les organismes du sol.
-L'assimilation : les matières organiques apportées aux sols sont utilisées par les organismes pour leur croissance et leur activité
-La minéralisation : l'assimilation entraine une respiration par les organismes et des émissions de CO_2 (respiration aérobie) ou d'autres gaz comme le CH_4. Cette minéralisation constitue la principale sortie de carbone du réservoir « sol ».

Ces étapes constituent les grandes étapes de décomposition des matières organique du sol. D'autres entrées peuvent avoir lieu, notamment dans le cas où les organismes vivants du sol produisent des déchets ou métabolites divers qui sont également déposés sur le sol (dans le cas des excréments animaux et des apports de produits résiduaires organiques par exemple) ou même directement injectés dans le sol comme c'est le cas pour les exsudats racinaires.
Comme cela a déjà été mentionné, la matière organique peut présenter des temps de résidence dans les sols très variables, de quelques jours-semaines à plusieurs centaines voire des milliers d'années (Von Lützow et al., 2008). Ces temps de résidence définissent des sous-réservoirs tels que les compartiments actifs, lents et passifs utilisés par certains modèles pour estimer les dynamiques du carbone au sein et entre ces différents réservoirs (Von Lützow et al., 2008). Ces pools sont néanmoins des représentations conceptuelles car en réalité, la matière organique du sol correspond à un continuum de matières plus ou moins complexes, plus ou moins labiles, en perpétuel renouvellement (Stockmann et al., 2013).

1.4. Biodégradation des matières organiques dans les sols

La biodégradation des MO dans les sols est contrôlée par la présence et la distribution spatiale des organismes du sol et tous les facteurs pouvant agir sur leur activité et leur accessibilité aux matières organiques.

1.4.1. Les microorganismes : acteurs principaux de la biodégradation

De nombreux et très divers organismes interviennent dans la biodégradation de la matière organique dans les sols, à différentes échelles spatiales et temporelles. La macrofaune (2-20 mm) comme les vers de terre et la mésofaune (0.1-2 mm) représentée par des organismes comme les acariens, les enchytréides ou les collemboles (Coleman et Wall, 2015) est responsable des premières étapes de la décomposition des MOS, à savoir, la fragmentation puis le brassage MO - sol.

Les microorganismes, représentés majoritairement par les bactéries et les champignons composent jusqu'à 13,5% des matières organiques vivantes du sol (Calvet, 2013a). Ils sont les principaux acteurs de la biodégradation et de la minéralisation des MOS (Baldock et Skjemstad, 2000) et sont des organismes clés des recyclages biogéochimiques (Coleman et al., 2018).
Un gramme de sol peut contenir entre 10^2 et 10^9 de bactéries (Ranjard et Richaume, 2001; Watt et al., 2006) et des millions de champignons. Le sol abrite également une grande diversité de microorganismes : on peut distinguer entre 100 000 et un million d'espèces de bactéries dans un gramme de sol (Torsvik et Øvreås, 2002). Si certaines espèces peuvent être associées à une fonction particulière au sein de la biodégradation, dans la majeure partie des cas, les relations entre diversité microbienne et fonctions sont difficiles à mettre en évidence du fait de la redondance fonctionnelle (espèces différentes ayant cependant les mêmes fonctions dans leur environnement).

Il existe de nombreuses méthodes permettant d'étudier l'abondance, la diversité, et les activités microbiennes (figure 1). Le nombre d'espèces cultivables est bien inférieur à celui des espèces totales du sol (Torsvik et al., 1998). Les méthodes moléculaires permettent d'accéder à un plus grand nombre de microorganismes. Les méthodes dites physiologiques permettent d'obtenir des informations sur la physiologie d'une cellule ou d'une communauté. Elles permettent par exemple d'étudier la croissance des microorganismes via des traceurs ou de

suivre l'activité des microorganismes par des mesures de respiration (minéralisation) ou suivi des enzymes dans le sol (Kandeler, 2007).

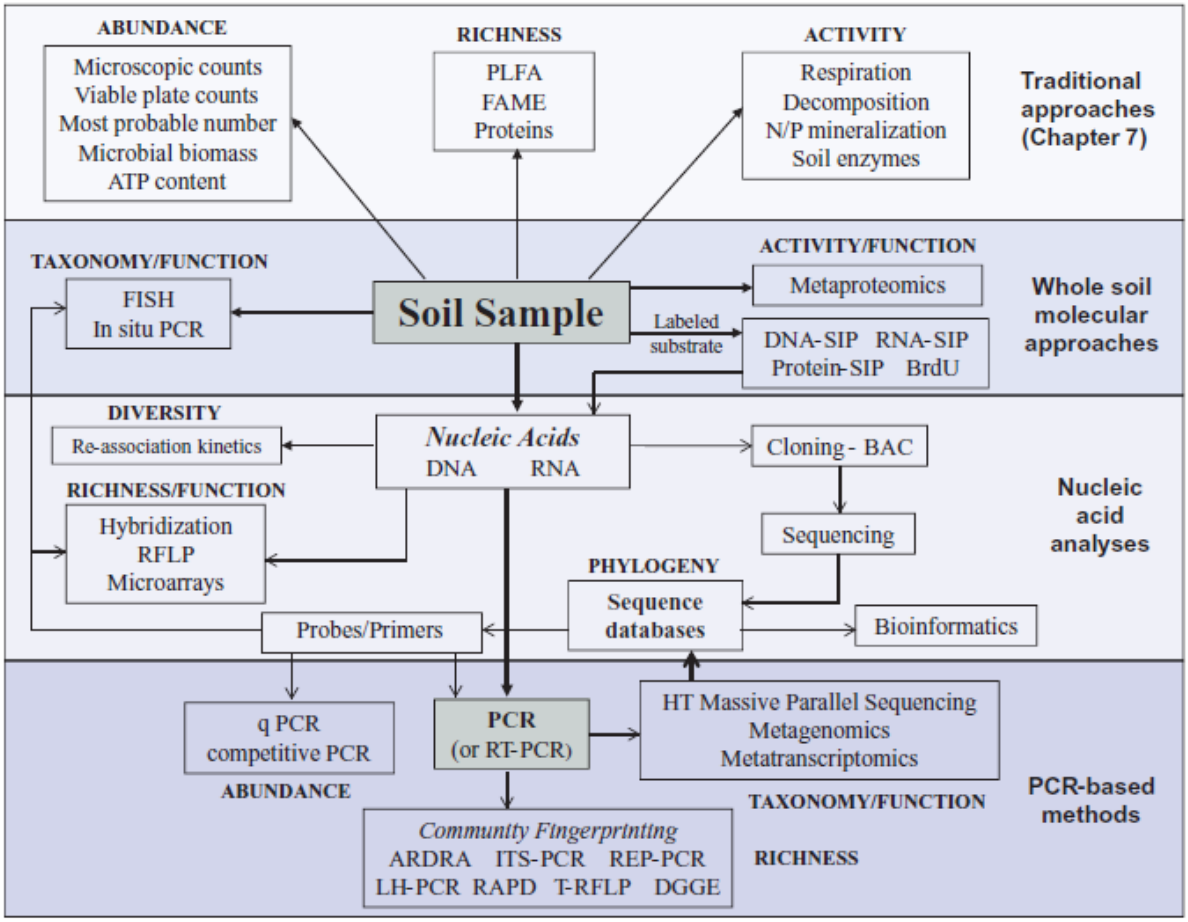


Figure 1 - Synthèse des méthodes de suivi des communautés microbiennes des sols. D'après Thies (2015)

Parmi les méthodes permettant d'étudier les communautés de microorganismes du sol au sein de leur environnement, l'extraction et l'analyse de PLFA (phospholipid fatty acids) sont utilisées depuis le début des années 80 (Frostegård et al., 2011). Cette méthode permet d'extraire des phospholipides contenus dans les membranes des microorganismes présents dans des échantillons de sols, de les quantifier et de les qualifier.

Leur nomenclature correspond au nombre d'atomes de carbone (x), au nombre de double liaisons (y) suivi de la position de cette double liaison à partir du groupe méthyl final de la molécule (z), sous la forme : Cx:yωz. Les préfixes a et i indiquent les branchements *anté-iso* ou *iso* et les configurations *cis* et *trans* sont indiqués par les lettres c et t respectivement à la fin du nom.

Ainsi, les PLFA peuvent servir d'indicateurs de différents groupes d'organismes. Ainsi les

PLFA *iso* (iC15:0, iC16:0, iC17:0) et *anté-iso* (aC15:0, aC17:0), saturés sont généralement associés aux bactéries gram-positives quand les PLFA mono-insaturés et cyclopropylés (C16:1ω7c, C18:1ω9c, C18:1ω9t) sont plutôt associés aux bactéries Gram-négatives. Les marqueurs associés aux champignons sont majoritairement polyinsaturés (C18:2ω6c, C18:2ω9c) mais certains mono-saturés existent aussi (Frostegård et al., 2011; Quideau et al., 2016).

A partir de la quantification de ces marqueurs, il est possible de réaliser des rapports pour obtenir une idée de l'organisation de la communauté microbienne (ratio gram+/gram- ou champignon/bactéries) mais cette organisation peut aussi être représentée via des analyses en composantes principales (ACP) des marqueurs.

Les PLFA peuvent, par ailleurs, être utilisés comme un indicateur de l'évolution des communautés dans le temps puisque le temps de demi-vie des PLFA libéré dans le sol après la mort des microorganismes est de quelques heures (Zhang et al., 2019).

1.4.2. Distribution des microorganismes et des matières organiques dans la structure du sol

Le sol est un milieu tri-phasique complexe et hétérogène qui se caractérise par sa structure, c'est-à-dire l'agencement de ses constituants solides qui définit la porosité.

Les pores et leur agencement modulent l'accès aux ressources présentes pour les microorganismes et contrôlent donc la biodégradation (Young et al., 2008). Bien que la porosité totale soit importante, c'est plutôt la taille et l'interconnexion des pores qui sont déterminantes pour définir l'habitabilité d'un sol (Voroney et Heck, 2015) et l'accessibilité des microorganismes aux ressources.

Bien que très abondants, les microorganismes ne colonisent qu'environ 1% du sol (Young et al., 2008) et présentent une distribution très hétérogène (Chenu et al., 2001; Ranjard et Richaume, 2001; Chenu and Stotzky, 2002). Ils colonisent des microenvironnements en fonction de leur taille, de leurs exigences de survie et d'activités différentes (ressources trophiques : autotrophes/hétérotrophes, exigences en termes d'eau, d'O_2, de pH…). Une grande partie des bactéries se trouve dans des pores d'environ 2 µm tandis que les champignons et les actinomycètes, eux, sont trop gros pour y pénétrer (Ranjard et Richaume, 2001). Les microorganismes présents dans les petits pores sont ainsi protégés des organismes prédateurs, trop gros pour y accéder (Ranjard et Richaume, 2001; Vargas et Hattori, 1986).

Une grande majorité des bactéries se trouvent à l'intérieur des agrégats plutôt qu'en surface (Ranjard et Richaume, 2001) et il semble que si les bactéries gram négatives préfèrent les parties interne des agrégats, les bactéries gram positives se trouvent aussi fréquemment dans les parties externe des agrégats, cette tendance étant particulièrement prononcée lorsque la teneur en eau est faible (Ranjard et Richaume, 2001; Ruamps et al., 2011).

Les matières organiques occupent une fraction minime du sol avec une forte hétérogénéité spatiale (Chenu et Plante, 2006; Peth et al., 2014) et sont surtout présentes (50 à 80% des MOS) dans les micro-agrégats du sol (entre 2 et 20 µm) .
En faisant varier le degré de porosité d'un sol, par tamisage et dispersion, avant d'y apporter des résidus végétaux, Juarez (2013) a déterminé la fraction porale impliquée dans la biodégradation. Après vérification de l'effet des traitements sur la porosité grâce à des images réalisées en tomographie à rayons X, il a été constaté que ceux-ci ont permis de modifier la porosité jusqu'à des pores de tailles supérieures à 13 µm. Par la suite, l'absence de différences de minéralisation entre les différents traitements a donc permis de supposer que la fraction non modifiée de chaque traitement (< 13µm) était celle en jeu dans la décomposition.
Les fractions les plus fines du sol contiennent des matières organiques résistantes à la biodégradation car adsorbées et/ou bénéficiant d'une protection physique face aux microorganismes et leurs enzymes au sein de ces micro-agrégats (Ranjard et Richaume, 2001).

1.4.3. Facteurs affectant la biodégradation des matières organiques dans les sols

Lorsque les microorganismes et les matières organiques sont co-localisés dans le sol, les conditions abiotiques locales rendent le milieu plus ou moins favorables à la survie et l'activité des microorganismes du sol et donc influent sur la biodégradation.
La croissance ou tout simplement le maintien d'une communauté microbienne plutôt qu'une autre, sont sous l'influence de l'environnement qui contrôle les conditions énergétiques, nutritionnelles, d'oxygénation, d'humidité du milieu, la température ou encore la structure du sol. Chaque espèce possède des capacités propres d'adaptation à son environnement permettant sa croissance et sa reproduction. En conséquence, les communautés microbiennes du sol varient selon les caractéristiques du milieu (Nunan et al., 2001, 2005; Ritz et Young, 2004).

Zogg et al. (1997) ont ainsi observé qu'une augmentation de la température impactait la structure des communautés du sol et stimulait la respiration.

Les microorganismes sont sensibles à la dessiccation et aux variations d'humidité (Van Gestel et al., 1993a). En aérobiose, la dessiccation du milieu entraine une diminution de la biomasse microbienne et de son activité alors que des conditions humides montrent des tendances inverses (Uhlířová et al., 2005). L'augmentation de la teneur en eau des sols est donc souvent reliée positivement à la quantité de matière organique retrouvée dans les sols puisque l'eau favorise la production de biomasse microbienne et végétale. Cependant, une trop grande quantité d'eau pouvant limiter la diffusion des gaz, et notamment de l'oxygène, cet effet peut s'inverser étant donné que l'anaérobie sera généralement moins favorable au développement d'une partie de cette même biomasse.

Enfin, bien que le milieu influe sur les microorganismes du sol, il faut ajouter que l'inverse est également vrai. En effet, les microorganismes ont également une certaine capacité à façonner leur habitat pour y maintenir les conditions qui sont favorables à leur survie. Ainsi certains champignons par exemple peuvent favoriser une redistribution de l'eau dans le sol mais également participer à l'agrégation des particules minérales du sol via leur mycélium (Ritz et Young, 2004; Guhr et al., 2016).

La biodégradation de la matière organique dépend par ailleurs de la nature des matières organiques. On distingue souvent les matières organiques simples constituées de petites molécules facilement dégradables (sucres, acides aminés) et souvent solubles des matières organiques complexes constituées de molécules plus difficilement dégradables ou récalcitrantes (cellulose, lignine) et donc plus stables (figure 2).

Cependant, même si leur qualité, à savoir leur composition élémentaire, leur structure moléculaire et l'abondance de groupes fonctionnels, peut ralentir leur biodégradation à court terme, à long terme d'autres mécanismes de protection peuvent devenir prépondérants. Par exemple, l'interaction des MO avec les surfaces minérales (argiles ou colloïdes), sur lesquelles elles s'adsorbent sous forme d'associations organo-minérales, apporte une protection physico-chimique. Enfin, les matières organiques peuvent également être protégées physiquement (Sollins et al., 1996; Balesdent et al., 2000; Six et al., 2002; Von Lützow et al., 2008; Dungait et al., 2012).

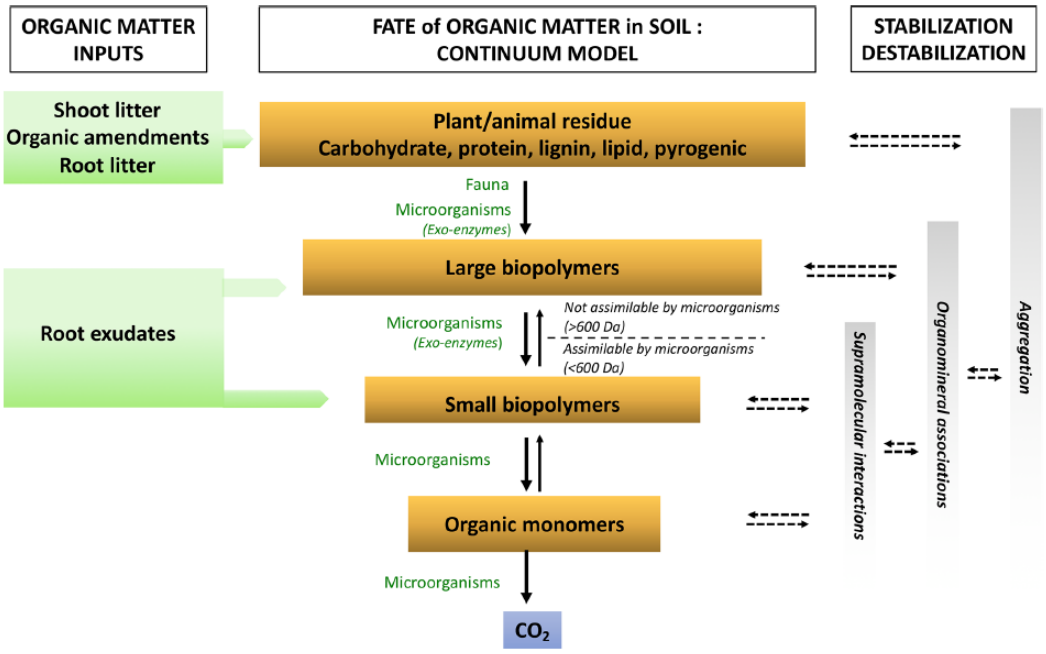


Figure 2 – Représentation du continuum de biotransformation des matières organiques du sol. La biodégradation est continue depuis les résidus animaux et végétaux jusqu'aux molécules les plus simples et leur minéralisation par les microorganismes du sol. Tout au long de ces étapes des mécanismes de stabilisation et déstabilisation peuvent avoir lieu. D'après Basile-Doelsch et al. (2020).

1.4.4. L'accessibilité comme facteur de biodégradation des MOS

Lorsque qu'il n'y a pas de co-localisation, l'accessibilité microorganismes-substrats est sous l'influence de mécanismes de transferts au sein du sol des matières organiques et des microorganismes par convection, diffusion et mobilité des microorganismes (croissance et déplacements mobiles) au sein du réseau poral. Ces phénomènes sont étroitement liés aux caractéristiques du sol comme la porosité, la teneur en eau du sol (Moyano et al., 2013) et des communautés microbiennes.

Pinheiro et al. (2015) ont par exemple montré que la distribution initiale des microorganismes et du 2,4-D (mélange homogène substrat-microorganismes, co-localisation dans un spot de taille mm et non co-localisation dans 2 spots distants de 2 cm) impactait fortement la minéralisation du 2,4-D. La minéralisation était maximale avec le mélange homogène, nulle après 14 jours lorsque microorganismes et substrat n'était pas co-localisés et intermédiaire pour une co-localisation dans un spot de taille millimétrique.

Angers et Recous (1997) ont montré que la taille des résidus apportés au sol avait un impact sur les dynamiques de minéralisation des résidus. Les résidus plus petits se décomposent plus rapidement que les plus gros du fait d'une augmentation de la surface de contact avec les microorganismes, les résultats étant modulés par le C/N des résidus. Les différences de dynamiques en lien avec le ratio C/N s'expliquent par l'importance de l'accessibilité à l'azote dans le processus de décomposition.
Toujours en lien avec l'accessibilité, la localisation initiale des résidus dans le sol est importante : la minéralisation est favorisée lorsque les résidus sont incorporés dans le sol et diminuée lorsque les résidus sont laissés en surface du sol (Coppens et al., 2006).

Negassa et al. (2015) ont montré que la minéralisation de résidus était favorisée lorsque la structure des sols était détruite, favorisant les probabilités de contact entre microorganismes et substrats.
L'augmentation de la densité apparente d'un sol et donc la diminution de la porosité du sol diminue la minéralisation d'un résidu apporté au sol. A l'inverse, l'augmentation de la porosité via des apports de sables par exemple stimule la minéralisation des résidus (Sleutel et al., 2012). La connectivité des pores est également primordiale pour l'accès des substrats aux microorganismes (Young et al., 2008). Enfin, l'augmentation de la tortuosité peut ralentir la diffusion des substrats et limiter l'accessibilité substrats-microorganismes. L'accessibilité est donc intrinsèquement liée à la porosité.

L'eau joue un rôle clef dans l'accessibilité et dans la biodégradation des MO (Stott et al., 1986; Poll et al., 2008). En effet, une forte teneur en eau serait à l'origine d'une diffusion plus forte des substrats solubles et des enzymes (Poll et al., 2008). La plupart des microorganismes du sol étant aérobies, les activités microbiennes augmentent avec la teneur en eau jusqu'à une valeur seuil où l'oxygène devient limitant (figure 3). Il a également été démontré que la localisation des bactéries était influencée par l'humidité puisque l'on trouve les bactéries plutôt dans la porosité intra-agrégats en conditions sèches, la rétention de l'eau étant par ailleurs plus forte dans la microporosité intra-agrégats (Ranjard et Richaume, 2001).

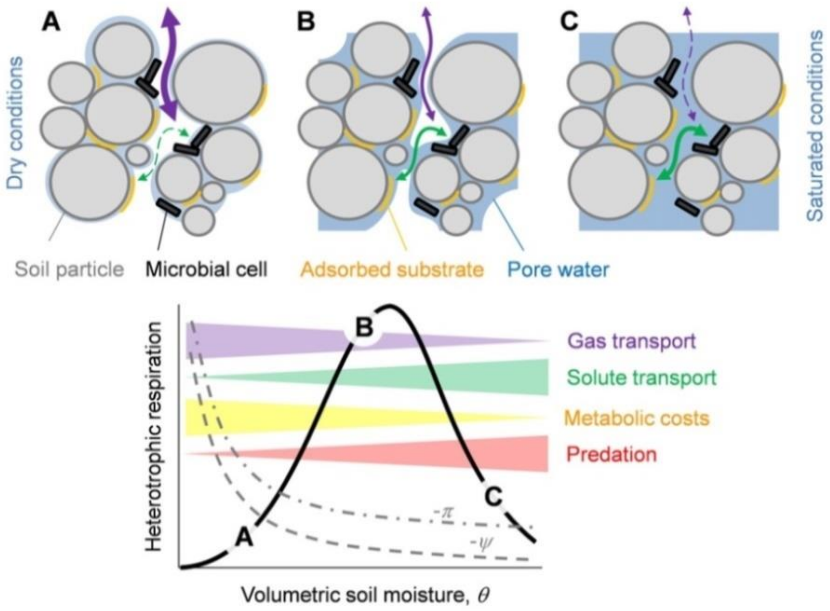


Figure 3 - Effet du potentiel matriciel d'un sol sur l'accessibilité et l'activité des microorganismes. D'après Moyano et al. (2013)

1.4.5. Rôle des bactéries et des champignons dans la dégradation des MO

Les microorganismes ne colonisent et ne sont pas transportés dans le sol tous de la même façon (tableau 1). En effet, le volume exploré par les bactéries est plus faible que celui exploré par les champignons de par leurs modes de colonisation contrastés (Coleman et al., 2018). De même, de par leur taille, les bactéries sont capables de coloniser des pores de plus petit diamètre (< 0,2 µm) que les champignons (< 5µm). Ces caractéristiques, en influençant la quantité de sol accessible aux microorganismes, influent donc sur les probabilités de rencontre microorganismes-substrats. Par exemple, la meilleure résistance à la sècheresse des champignons (Yuste et al., 2011) leur permettra d'avoir une plus grande influence dans ces conditions que les bactéries. En revanche, étant exclusivement aérobies, ils nécessitent de l'oxygène pour assurer leurs fonctions et en conditions anaérobies seules les bactéries seront responsables de la biodégradation.

Cet effet de l'accessibilité sur les communautés microbiennes pourrait influencer la biodégradation dans son ensemble. En effet, bien que cela ne soit pas si clair (Thiet et al., 2006), il est souvent avancé que le rendement d'assimilation est plus élevé chez les champignons (Coleman et al., 2018). Il est également généralement admis que les bactéries

dégradent plutôt des substrats simples alors que les champignons sont capables de dégrader des substrats plus complexes bien qu'en réalité les champignons interviennent également dans les phases précoces de la biodégradation et les bactéries également dans les phases plus tardives (Kramer et al., 2016). Ainsi, lors de la dégradation des résidus végétaux, les bactéries pourraient intervenir dans un premier temps avant de laisser la place aux champignons lorsque les substrats simples ont été dégradés.

Ainsi, en manipulant le ratio champignons/bactéries par des apports de MO de différentes natures, une modification de la porosité ou du pH, Sleutel et al. (2012) ont montré que la minéralisation était diminuée lorsque le ratio champignons/bactéries augmentait.

Tableau 1 - Comparaison des différentes propriétés intrinsèques des bactéries et des champignons. D'après Coppens et al. 2006; Ekschmitt et al. 2008; Kuzyakov et Blagodatskaya, 2015 et Coleman et al. 2018

	Bactéries	**Champignons**
Volume exploré	+	++
Tailles des pores colonisés	< 0,2 µm	< 5µm
Rendement d'assimilation	+	++
Résistance à la sècheresse	-	+
Besoins en O_2	Aérobie / anaérobie	Aérobie
Capacité de dégradation	Substrat simples	Substrats simples et complexes

1.5. La dégradation des matières organiques au sein de la détritusphère

1.5.1. Hot-spots et hot-moments

Le sol se caractérise donc par une mosaïque de microenvironnements ou de hot spots qui sont souvent définis en tant que sphères d'influence permettant de distinguer les zones d'occupation préférentielles du sol par les microorganismes: la détritusphère, composée du sol

entourant les débris végétaux, la rhizosphère, zone d'influence des racines dans le sol, la drilosphère, ensemble des galeries et modifications porales induites par la présence des vers de terre et enfin les espaces inter et intra agrégats (Kuzyakov and Blagodatskaya, 2015).

Les microorganismes ne sont pas distribués de manière homogène dans le sol. De plus, le sol étant un milieu pauvre en éléments nutritifs, la plupart d'entre eux sont en état de dormance (Blagodatskaya et Kuzyakov, 2013). Lors de l'arrivée de MO, les microorganismes redeviennent actifs et on observe ainsi des petits volumes de sol (hotspots) où les abondances et les activités microbiennes sont plus importantes que dans le reste du sol (Kuzyakov et Blagodatskaya, 2015). Les hotspots peuvent couvrir des distances allant du µm au cm. Ces changements sont à l'origine de phénomènes appelés hot-moments (Kuzyakov et Blagodatskaya, 2015) dont la durée peut aller de quelques heures à quelques mois (figure 4). Les hot-spots font bien souvent suite à l'apparition d'un phénomène de hot-moments mais ils peuvent perdurer au-delà de la durée de vie du hot-moment lui-même (figure 4).

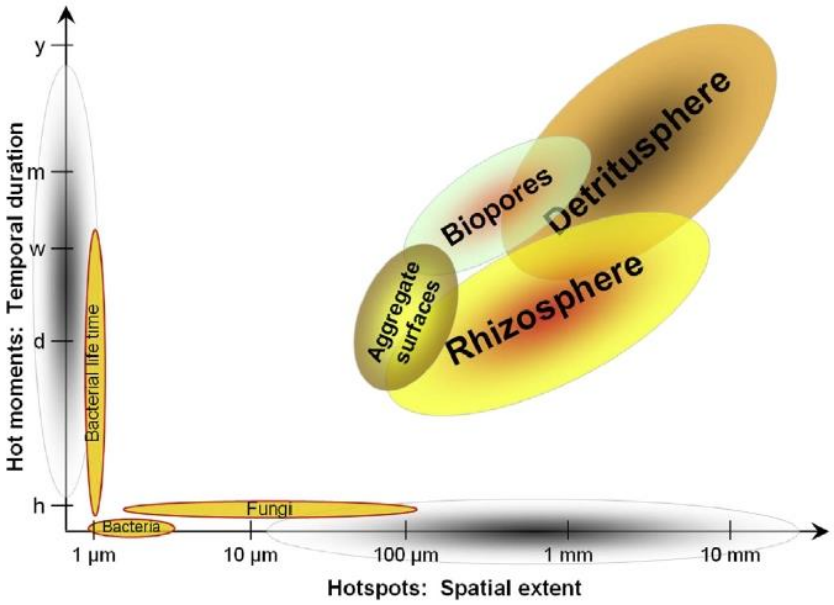


Figure 4 - Echelles spatiales et temporelles caractérisant les hot-moments et les hot-spots dans le sol. D'après Kuzyakov et Blagodatskaya (2015)

1.5.2. Définition de la détritusphère et ses caractéristiques

Les résidus végétaux sont une des sources majeures d'entrée de matières organiques vers le sol. Ces entrées de matière organique riches en composés de haut degré de polymérisation ont lieu à la surface du sol ou directement dans le sol via les racines des végétaux après leur mort. Leur présence dans le sol induit une augmentation de la biomasse et de l'activité des organismes, et principalement des microorganismes, en charge de leur décomposition (Kuzyakov et Blagodatskaya, 2015). La litière ainsi que la zone de sol influencée par celle-ci constitue la détritusphère et est considérée comme étant un des hotspots les plus importants et un site majeur de minéralisation et de stabilisation des matières organiques.

Les caractéristiques de la détritusphère varient en fonction de la qualité des résidus et de leur localisation (en surface ou sous la surface du sol). En effet, les apports en surface sont plus souvent constitués de résidus complexes issus de la mort principalement des végétaux (feuilles, bois, tiges, fruits…) mais aussi de déchets issus de l'activité des animaux en surface (déjections) ou d'apports de MO exogènes (apports de fumier au champ ou autres produits résiduaires organiques). Les apports générés en profondeur sont constitués de tissus morts (racines) (Kögel-Knabner, 2002) voire de matières apportées en surface enfouies par les vers de terre. La composition des résidus et notamment leur proportion en lignines, hémicelluloses, celluloses et composés organiques solubles a une influence sur la détritusphère (diffusion de C soluble dans le sol, translocation de C par les champignons), comme montré par Gaillard et al. (2003).

Les composés solubles des résidus végétaux peuvent être répartis dans le sol par mécanismes de transfert par advection, par diffusion ou encore par translocation (Marschner et al., 2012; Kuzyakov et Blagodatskaya, 2015). Ainsi on observe généralement dans le cas de la détritusphère un gradient de composés organiques, de biomasse microbienne (Poll et al., 2006) et d'activité enzymatique (Gaillard et al., 1999; Poll et al., 2006; Kuzyakov et Blagodatskaya, 2015) ainsi que des communautés différentes selon la distance aux apports (Poll et al., 2006, 2010) .

La taille de la détritusphère a été étudiée à plusieurs reprises à travers la distribution de plusieurs types d'analytes tout autour d'apports de matières organiques. L'ensemble des études montrent une zone d'influence de l'ordre du millimètre (Gaillard et al., 1999, 2003; Poll et al., 2006; Bastian et al., 2009; Marschner et al., 2012) pouvant varier selon le système

expérimental et les marqueurs mesurés (marqueurs microbiens, activités enzymatiques). En général, les volumes de sol impliqués sont légèrement plus faibles lorsque les activités enzymatiques sont ciblées (Gaillard et al., 1999; Kandeler et al., 2002; Poll et al., 2006) et peuvent également varier en fonction du type d'enzyme étudiée (Kandeler et al., 2002; Marschner et al., 2012).

1.5.3. Place et rôle des microorganismes au sein de la détritusphère

La dégradation du résidu stimule la croissance des microorganismes au sein de la détritusphère (Nicolardot et al., 2007). Poll et al. (2006) ont observé, via le suivi de PLFA une augmentation de la biomasse sur 4 mm après 24 semaines dans des incubation de sol avec des résidus de feuilles de blé en comparaison aux témoins sans apport. De même, Poll et al. (2008) ont observé suite à une incubation de résidus de seigle, un gradient de biomasse microbienne avec des valeurs plus importantes entre 1 et 2 mm du résidu qu'entre 2 et 3 mm et supérieures au sol témoin.
Ces gradients sont observés à la fois pour les bactéries ou les champignons (Marschner et al., 2012). Cependant il semblerait que les champignons se développent particulièrement au contact du résidu entrainant des gradients moins étalés dans le sol (Nicolardot et al., 2007) que ceux des bactéries se développant dans le sol plutôt en fonction des apports reçus depuis le résidu. Les gradients varient également en fonction des types de transfert d'eau dans le sol (advection contre diffusion). Poll et al. (2006) ont montré que le gradient de bactéries (plus dépendantes des transports passifs) était moins marqué en présence d'advection que de diffusion tandis que celui des champignons (moins dépendants des transports passifs) était similaire en conditions de diffusion et d'advection.

Suite à un apport de résidus, la détritusphère se met en place relativement rapidement. Les transports de C soluble des résidus dans le sol sont généralement rapides, en seulement quelques jours en conditions d'advection ou de diffusion (Gaillard et al., 1999, 2003; Poll et al., 2008). Les communautés microbiennes se développent également très rapidement en conséquence, notamment les bactéries qui dominent généralement les phases initiales de la décomposition (Poll et al., 2008). Marschner et al. (2011) ont mesuré un maximum de marqueurs bactériens dans la détritusphère aux jours 2 et 4 de leur incubation, soit en quelques jours seulement.

Au fur et à mesure de la décomposition des résidus, différents auteurs ont mis en évidence des modifications de communautés microbiennes de stratèges r vers des stratèges K (McMahon et al., 2005; Poll et al., 2008, 2010; Bastian et al., 2009; Marschner et al., 2011, 2012) et aux bactéries succèdent souvent des champignons (McMahon et al., 2005; Poll et al., 2008; Marschner et al., 2011, 2012) bien que les champignons comme les bactéries puissent être impliqués dans toutes les phases de la biodégradation (Kramer et al., 2016).
Ces successions s'expliquent par les différentes capacités de dégradation des bactéries et des champignons. En effet, les bactéries sont généralement considérées comme copiotrophes (ou stratèges r) c'est-à-dire ayant un développement rapide et plutôt spécialisées dans l'utilisation de substrats simples quand les champignons sont plutôt considérées comme des organismes oligotrophes (ou stratèges K) au développement lent et spécialisés dans la dégradation de substrats plus complexes. D'autres auteurs ont en revanche montré que bactéries et champignons pouvaient être impliqués aux différents stades de décomposition et ont plutôt observé des successions d'espèces différentes parmi les bactéries et les champignons (Kramer et al., 2016).

1.5.4. Impact du potentiel matriciel

1.5.4.1. Rétention de l'eau dans le sol

Dans le sol, les forces de rétention sont l'effet de la matrice solide sur l'eau qu'elle contient via les forces d'adsorption ou capillaires. La quantité d'eau retenue par le sol dépendra de plusieurs facteurs comme la nature des constituants du sol ou sa structure.

La teneur en eau du sol correspond à la quantité d'eau retenue dans le sol. Il existe plusieurs façons de la caractériser :

(1) $Teneur\ en\ eau\ massique\ (\omega)(g.g^{-1}) = \dfrac{masse\ d'eau\ contenue\ par\ le\ sol\ (g)}{masse\ de\ sol\,\mathrm{sec}\ (g)}$

(2) $Teneur\ en\ eau\ volumique\ (\theta)(cm^3.cm^{-3}) = \dfrac{volume\ d'eau\ contenue\ par\ le\ sol\ (cm^3)}{volume\ apparent\ (cm^3)}$

Le plus souvent celle-ci est déterminée par mesure thermogravimétrique, soit par prélèvement d'un cylindre de sol, qui est pesé avant ($m_{échantillon}$) et après dessiccation (à 105°C pendant 2

jours) (m_{sol}) : soit $\omega = (m_{échantillon} - m_{sol}) / m_{sol}$, soit (1).
A noter que la connaissance de la masse de sol sec (m_{sol}) et du volume apparent (V_a) permet d'en connaitre la densité apparente, $\rho_a = m_{sol} / V_a$. Celle-ci dépend de l'arrangement des constituants solides et est souvent comprise entre 1,3 et 1,6 $g.cm^{-3}$ (Calvet, 2013b).

L'existence de forces dans le sol liées à la nature poreuse du sol (forces capillaires) ou à la présence d'argiles (force d'adsorption) caractérisent la force exercée par la matrice du sol sur l'eau, la force matricielle, à l'origine du potentiel matriciel (ψm) = potentiel capillaire (ψc) + potentiel d'adsorption (ψa), souvent réduit à ψm= ψc, ψa étant négligeable dans un sol non sec (Calvet, 2013b).
L'énergie à fournir pour vider l'eau d'un pore est d'autant plus grande que le rayon du ménisque que forme l'eau est petit. Ainsi, dans le sol, lorsque le potentiel matriciel augmente, la teneur en eau diminue en premier lieu dans les pores dont les rayons sont les plus larges ou la force de capillarité est plus faible puis vers les pores les plus fins, où la force de capillarité augmente. Le potentiel matriciel est souvent exprimé par le pF, équivalent à log $|\psi_m|$, où ψm est exprimé en cm (Calvet, 2013b).
Ainsi, les évolutions des teneurs en eau en fonction du potentiel matriciel (courbes de rétention) seront différentes entre un sol sableux, limoneux ou argileux. En effet, la déshydratation d'un sol sableux aura lieu pour des potentiels matriciels plus faibles que pour un sol limoneux. Cela est dû à la présence d'un nombre plus important de pores de petite taille dans des sols limoneux retenant l'eau plus fortement.
Ces courbes peuvent être obtenues à l'aide de presses de Richards. Ce dispositif permet d'appliquer à des échantillons de sol saturés des pressions plus ou moins fortes afin de les déshydrater et les équilibrer à un potentiel matriciel voulu. Ainsi, en réalisant des pesées du sol à saturation, après chaque rééquilibrage à différentes pressions puis après séchage, il est possible d'établir une courbe de la teneur en eau pour chaque pression, équivalente à un pF donné. Il est également important de noter que cette courbe ne sera pas la même si l'on prend en considération une déshydratation, comme c'est le cas avec cette méthode, où une réhydratation du sol (phénomène d'hystérésis) (Calvet, 2013b).

1.5.4.2. Impact du potentiel matriciel en eau sur la détritusphere

Comme cela a déjà été développé dans le paragraphe expliquant les facteurs favorisant la biodégradation des matières organiques, l'eau est un facilitateur d'accès entre microorganismes et substrats en favorisant la diffusion. Il n'est donc pas surprenant que l'eau du sol soit également un facteur influant fortement sur la détritusphère.

En effet, l'augmentation de la teneur en eau participe à une augmentation de la quantité de substrat diffusée. Cependant, contrairement à ce qu'on pourrait supposer, aucun effet sur la taille de la détritusphère n'a été démontré (Poll et al., 2008, 2006). En revanche, Poll et al. (2006) montrent que la teneur en eau du sol modifie la cinétique du transport de C, du développement des microorganismes et de l'excrétion d'enzymes alors qu'en condition d'advection ce n'est pas le cas.

Les quantités de PLFA retrouvées dans la détritusphère d'un sol soumis à deux potentiels matriciels différents tendent à montrer que celui-ci a une influence sur les communautés de microorganismes du sol. Par exemple, les communautés fongiques sont affectées par le potentiel matriciel dans les phases initiales de l'incubation principalement quand la diffusion initie le transport de matières organiques vers le sol mais pas au-delà (Poll et al., 2010).

Dans leur étude, Poll et al. (2006) trouvent que le développement de microorganismes est plus important à pF2,5 qu'à pF1,8 en conditions plus humides, au contact d'apports de feuilles de maïs et expliquent ce résultat inattendu par des mesures trop tardives des marqueurs microbiens (après 2 semaines d'incubation) ayant possiblement diminué suite à la consommation des substrats présents en début d'expérience dans la détritusphere. Cette constatation permet néanmoins de supposer que le potentiel matriciel et la diffusion au sein de la détritusphère sont d'une importance primordiale pour les dynamiques de biodégradation en jeu. Enfin dans cette même étude, aucun impact de la diffusion des composés solubles n'est observé sur la quantité de microorganismes dégradants quantifiés au contact des apports (Poll et al., 2006).

D'autre part, les conditions de diffusion semblent avoir moins d'effet que les conditions d'advection provoqués par des pluies ou la fonte d'eau en surface qui permettent des transferts de matières organiques vers le sol de manière plus importante que dans le cas de la diffusion simple (Babey et al., 2017). Il a déjà été observé dans des incubations de sol et de maïs que l'irrigation du système entrainait des transferts de MO plus importants et sur de plus longues distances dans le sol qu'en conditions de diffusion (Poll et al., 2006). Des résultats similaires

ont été observés avec le 2,4-D (Pinheiro et al., 2015 ; 2018). Les déplacements passifs des microorganismes étant plus fréquents, les conditions d'advection peuvent également favoriser le transfert de microorganismes sur de plus longues distances et affecter l'accessibilité substrat-microorganismes (Pinheiro et al., 2015, 2018).

1.6. Modèles de prédiction de la dynamique des MOS dans les sols

Une partie des modèles actuellement utilisés pour décrire les dynamiques du carbone dans le sol sont des modèles prédictifs qualifiés de « compartimentaux » qui décrivent les évolutions du carbone au sein d'unités fonctionnelles ne prenant pas ou peu en compte les processus microscopiques du sol alors que c'est à cette échelle que la biodégradation des matières organiques à lieu.

Afin d'obtenir des prévisions robustes, des améliorations essentielles visant à intégrer des aspects rendant compte de l'hétérogénéité spatiale à ces échelles sont préconisées via une vision « mécaniste » (Manzoni et Porporato, 2009; Ebrahimi et Or, 2014). Cependant il existe peu de représentations mécanistes du sol à petite échelle (Manzoni et Porporato, 2009). Quelques modèles ont été récemment développés prenant en compte la structure du sol à partir d'images tomographiques aux rayons X. Différentes approches existent : par utilisation d'unités géométriques (Monga et al., 2008) ou directement à l'aide des voxels (Vogel et Roth, 2001). Chaque unité comprend alors un modèle simple prenant en compte l'environnement proche et permettant d'appliquer des équations de transferts reproduisant les dynamiques des fluides complexes du réseau poral. Des cellules bactériennes et des matières organiques de différentes formes (du carbone organique dissout aux matières organiques particulaires) sont répartis dans le volume 3D du sol soit dans les parties solides soit au sein des pores. Un module décrit l'activité des microorganismes, pouvant être individuel prenant en compte leur caractéristiques propres (position, espèce, masse, taux de prélèvement, etc.) (Portell et al., 2018) ou plus global prenant en compte les caractéristiques de tous les microorganismes (Monga et al., 2008).

Au sein de ces modèles, le remplissage en eau des pores peut par ailleurs être appliqué à différents degrés permettant une utilisation en conditions variées. Cependant, toutes les données nécessaires à l'amélioration de ces modèles ne sont pas encore réunies pour décrire précisément l'hétérogénéité du sol en 3 dimensions et à des échelles micrométriques. La répartition des microorganismes selon le type de microorganismes et selon la teneur en eau

sont peu documentés par exemple.

1.7. Objectifs, problématiques et démarche

L'ensemble des connaissances rassemblées dans cette synthèse bibliographique a permis la mise en évidence de plusieurs faits. Tout d'abord, la minéralisation des matières organiques du sol dépend (entre autres) de l'accessibilité des microorganismes aux substrats. Si on considère la détritusphere, les facteurs identifiés sont : la localisation initiale des matières organiques et des microorganismes dans la détritusphère mais aussi l'organisation du réseau poral du sol et son degré de remplissage par l'eau. D'autre part, la structure de la communauté microbienne peut avoir un impact sur la dégradation de la matière organique du sol selon ses capacités d'exploration du milieu et de dégradation propres.

Les conditions d'incubation dans les études sur la détritusphère sont variées mais aucune d'entre elle n'a encore étudié les effets d'une faible teneur en eau (pF>3) sur la biodégradation. Egalement, ces études ne permettent pas de bénéficier d'une approche à plusieurs échelles allant du µm au cm ou au-delà. Cela permettrait pourtant d'améliorer la précision des modèles utilisés pour la prédiction du devenir du carbone dans l'environnement. On sait notamment qu'il existe un certain volume de sol impliqué dans la minéralisation d'un substrat organique mais il n'y a pas pour le moment de relation simple entre ce volume et la minéralisation. Rendre compte de cette relation volume-minéralisation serait utile notamment pour estimer l'échelle à laquelle se déroulent les processus de biodégradation et cibler les descripteurs de cette relation afin de mieux atteindre les objectifs fixés pour une modélisation plus précise du devenir du carbone du sol.

Ce travail de thèse avait donc pour objectif d'évaluer l'impact de la teneur en eau du sol sur le fonctionnement de la détritusphère. Ainsi un suivi de l'évolution spatio-temporelle de résidus végétaux, des microorganismes et de leur activité a été réalisé sur des échelles allant du µm au cm.

Pour répondre à cet objectif, nous avons développé une approche expérimentale en microcosmes de sol dans lesquels nous avons appliqué 3 différents potentiels matriciels avec apports de substrats organiques marqués, complexes et localisés. L'activité et le devenir des microorganismes ainsi que du carbone ont été suivi via des mesures de minéralisation et des

analyses élémentaires, isotopiques et biologiques. La localisation des microorganismes et de leur activité a également été suivie et visualisée par microscopie à fluorescence et par nanoSIMS (figure 5).

Différentes échelles spatiales ont été explorées. Une partie du travail a été réalisée sur des systèmes de taille centimétriques à millimétriques puis une autre partie a été effectuée à une échelle millimétrique à micrométrique afin de mettre en relation les phénomènes observés à l'échelle du cosme et ceux observés à micro-échelle (figure 5).

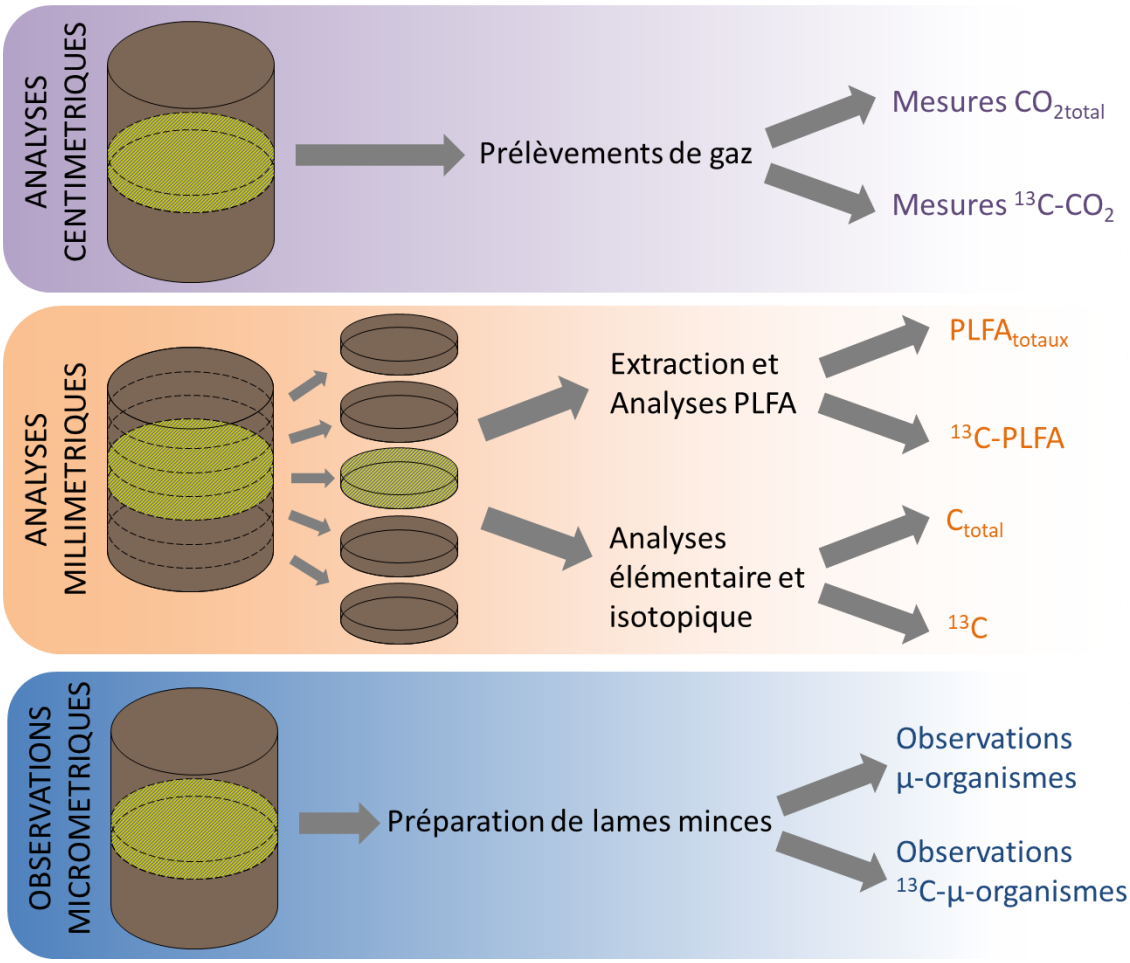


Figure 5 - Schéma récapitulatif des différentes mesures effectuées sur les cosmes à échelle centimétrique, à échelle millimétrique et micrométrique

Plus spécifiquement, nous avons cherché à répondre aux questions suivantes :

Question 1 : Quel est l'impact du potentiel matriciel et en particulier en conditions de sol sec sur la biodégradation de résidus végétaux localisés ?

Question 1: What is the impact of the matric potential and particularly under dry soil conditions on the biodegradation of localized plant residues?

Cette question sera traitée dans le Chapitre 3 – Evolution spatio-temporelle de hot-spots de detritusphere à différentes teneurs en eau du sol

Question 2 : Quels volumes de sol et quelles communautés microbiennes sont impliqués dans la détritusphère et comment sont-ils modulés par la teneur en eau ?

Question 2: What volumes of soil and what microbial communities are involved in the detritusphere and how are they modulated by water content?

Cette question sera traitée dans le Chapitre 3 – Evolution spatio-temporelle de hot-spots de detritusphere à différentes teneur en eau du sol

Question 3: Quel est l'impact du potentiel matriciel sur le priming effect après apport de résidus végétaux au sol ?

Question 3: What is the impact of the matric potential on the priming effect after adding plant residues to the soil?

Cette question sera traitée dans le Chapitre 4 – Priming effect induit par la biodégradation d'un résidu végétal à différents potentiel matriciels

Question 4: Quelles méthodes pour visualiser les microorganismes et leurs activités dans des hot spots de type détritusphere?

Question 4: Which methods to visualize microorganisms and their activities in detritusphere hot-spots?

Cette question sera traitée dans le Chapitre 5 – Méthodes et limites pour visualiser les microorganismes et leurs activités dans les habitats microbiens du sol

Question 5 : Quel est l'impact du potentiel matriciel sur la répartition des microorganismes dans le sol ?

Question 5: What is the impact of the matric potential on the distribution of microorganisms in the soil?

Cette question sera traitée dans le Chapitre 6 – Evolution spatio-temporelle des microorganismes totaux et actifs à une échelle µm à mm dans la détritusphère

Question 6 : Quels sont les sites de biodégradation de la matière organique dans le sol ?
Question 6: Where are the sites of biodegradation of organic matter in the soil?
Cette question sera traitée dans le Chapitre 6 – Evolution spatio-temporelle des microorganismes totaux et actifs à une échelle µm à mm dans la détritusphère

Cette thèse s'inscrit dans le projet « Soilµ3D – Propriétés émergentes des fonctions microbiennes dans les sols : Identification de descripteurs spatiaux de la structure du sol à partir de modélisations 3D à l'échelle des habitats microbiens ». Il a pour ambition de modéliser la biodégradation des matières organiques par les microorganismes du sol à l'échelle des micro-habitats et cela en trois dimensions afin de répondre aux besoins actuels de la recherche.

1.8. Organisation du mémoire

Introduction générale / *General introduction*

Chapitre 1 – Synthèse bibliographique
Chapter 1 – Bibliographic synthesis

Chapitre 2 – Etude du volume de sol impliqué dans la biodégradation d'un substrat organique – Mises au point méthodologiques
Chapter 2 – Study of soil volume involved in organic substrate biodegradation – Methodological aspects

Chapitre 3 – Evolution spatio-temporelle de hot-spots de detritusphere à différentes teneur en eau du sol
Chapter 3 – Spatial and temporal evolution of detritusphere hotspots at different soil moistures

Chapitre 4 – Priming effect induit par la biodégradation d'un résidu végétal à différents potentiel matriciels
Chapter 4 – Priming effect induced by plant residue biodegradation at different matric potentials

Chapitre 5 – Méthodes et limites pour visualiser les microorganismes et leurs activités dans les habitats microbiens du sol
Chapter 5 – Methods and limits in imaging microorganisms and their activities in soil micro-habitat

Chapitre 6 – Evolution spatio-temporelle des microorganismes totaux et actifs à une échelle µm à mm dans la détritusphère
Chapter 6 – Spatial and temporal evolution of total and actives microorganisms from µm to mm scale in detritusphere

Discussion générale / *General discussion*

Conclusion / *Conclusion*

Chapitre 2: Etude du volume de sol impliqué dans la biodégradation d'un substrat organique – Mises au point méthodologiques

Chapter 2 : Study of soil volume involved in organic substrate biodegradation – Methodological aspects

2. Etude du volume de sol impliqué dans la biodégradation d'un substrat organique – Mises au point méthodologiques

2.1. Introduction

Pour répondre aux objectifs de la thèse, à savoir l'étude de la biodégradation de résidus végétaux dans le sol de l'échelle micrométrique à centimétrique, nous avons choisi une démarche expérimentale en conditions de laboratoire. Tout le travail de thèse a été basé sur la construction de 2 types de cosmes de sol de tailles différentes (57 ou 20 mm de diamètre pour 40 mm de haut, soit 132,6 g ou 16,3 g de sol par cosme), composés de 2 demi-cosmes de sol (57 ou 20 mm de diamètre pour 20 mm de haut) re-compactés à une densité apparente de 1,3 $g.cm^{-3}$ et d'une couche centrale de résidus végétaux marqués ($\delta^{13}C$ = 1947.1 ‰, contenant 410 $g\ kg^{-1}$ de carbone et 21.2 $g\ kg^{-1}$ d'azote) (165,8 ou 20,4 mg). Les cosmes les plus larges ont été utilisés pour effectuer un suivi de la minéralisation, du devenir ^{13}C et des communautés microbiennes et les cosmes plus fins dans le but de réaliser des lames minces (figure 6). Ces cosmes ont ensuite été incubés à 3 potentiels hydriques (pF1,5 ; 2,5 et 3,5) pour étudier l'impact de la teneur en eau sur la détritusphère.
Pour répondre à ces objectifs, un travail méthodologique a été dans un premier temps nécessaire dans le but de :

- Faire varier les caractéristiques du réseau poral pour impacter les transferts dans les sols et donc l'accessibilité substrats-microorganismes,

- Ajuster la teneur en eau du sol sans détruire les agrégats pour conserver intacte la structure du sol

- Standardiser la découpe des cosmes pour les mesures à une échelle millimétrique

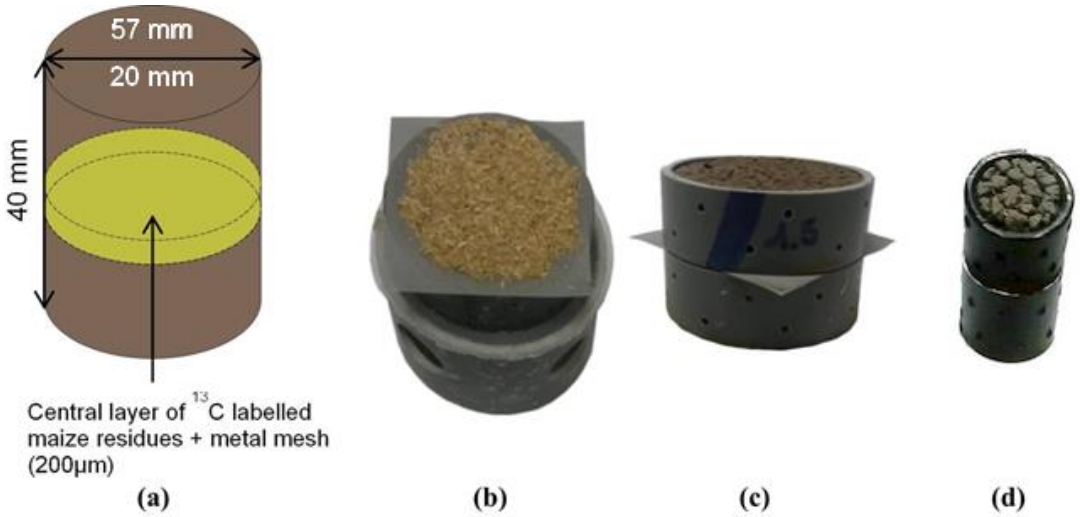


Figure 6 – Construction d'un cosme (a). Application de la couche de résidus (b). Cosme fini (57 mm de diamètre pour 40 mm de hauteur) (c). Cosme fini (20 mm de diamètre pour 40 mm de hauteur) (d).

2.2. Comment faire varier la porosité du sol dans les cosmes ?

Pour manipuler les caractéristiques du réseau poral dans les cosmes, différentes solutions existent : travailler avec des sols de textures contrastées (sableuse vs limoneuse), travailler avec des sols plus ou moins compactés *in situ* (sol cultivé *vs* prairie par exemple, sol cultivé en agriculture conventionnelle *vs* agriculture de conservation…) ou de manière artificielle, en manipulant la structure du sol *via* des tamisages, la dispersion des particules de sol.... Nous avons choisi de travailler avec un seul et même sol pour essayer de limiter au maximum l'effet d'autres facteurs. Nous avons également choisi d'éliminer la compaction artificielle en conditions de laboratoire, l'hypothèse sous-jacente étant que la compaction allait principalement modifier la macroporosité. La manipulation de la structure s'est révélée inefficace pour faire varier des pores de petite taille (Juarez, 2013). Au final, nous avons donc choisi de travailler avec un seul sol cultivé de manière conventionnelle (CONV) avec un labour fréquent (3 ans sur 4) ou en agriculture de conservation sous couvert végétal (SCV) (en non labour mais avec une couverture végétale permanente).

Les échantillons de sol ont été prélevés à La Cage (Versailles) durant une culture de blé entre 5 et 10 centimètres de profondeur (figure 7), les 5 premiers centimètres ayant été éliminés à cause de teneurs en carbone et azote différentes (figure 8). Le sol a ensuite été tamisé entre 2

et 5 millimètres pour homogénéisation et pour pouvoir construire par la suite des cosmes avec une structure du sol standardisée.

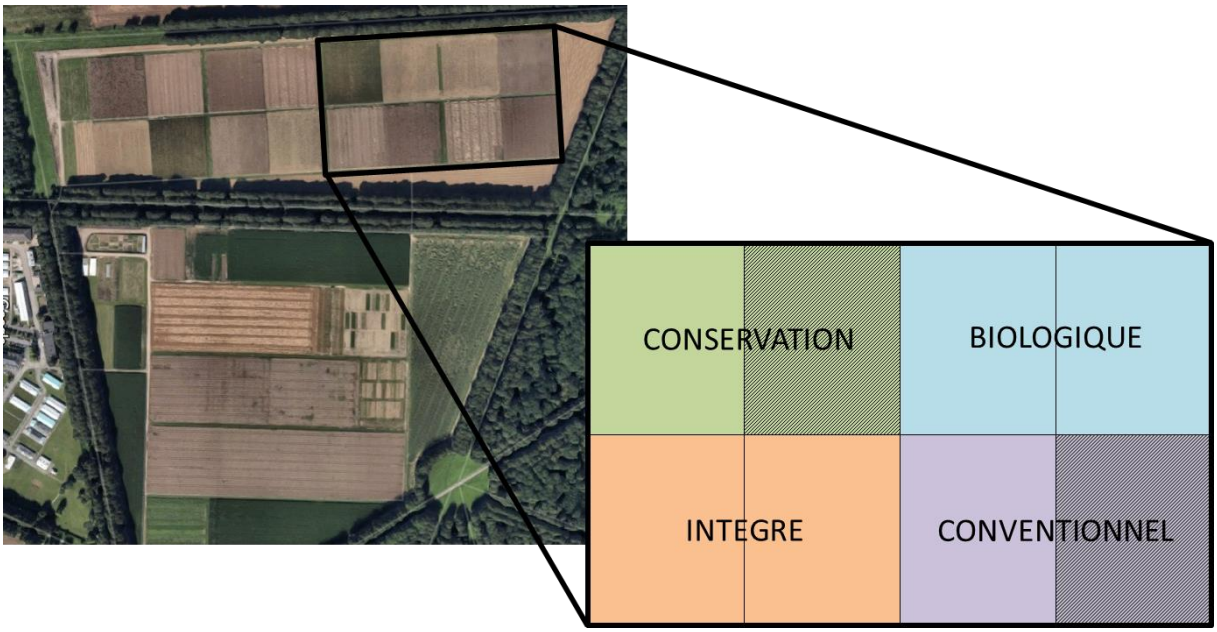


Figure 7 - Vue aérienne du site expérimental de La Cage avec blocs de prélèvement foncés

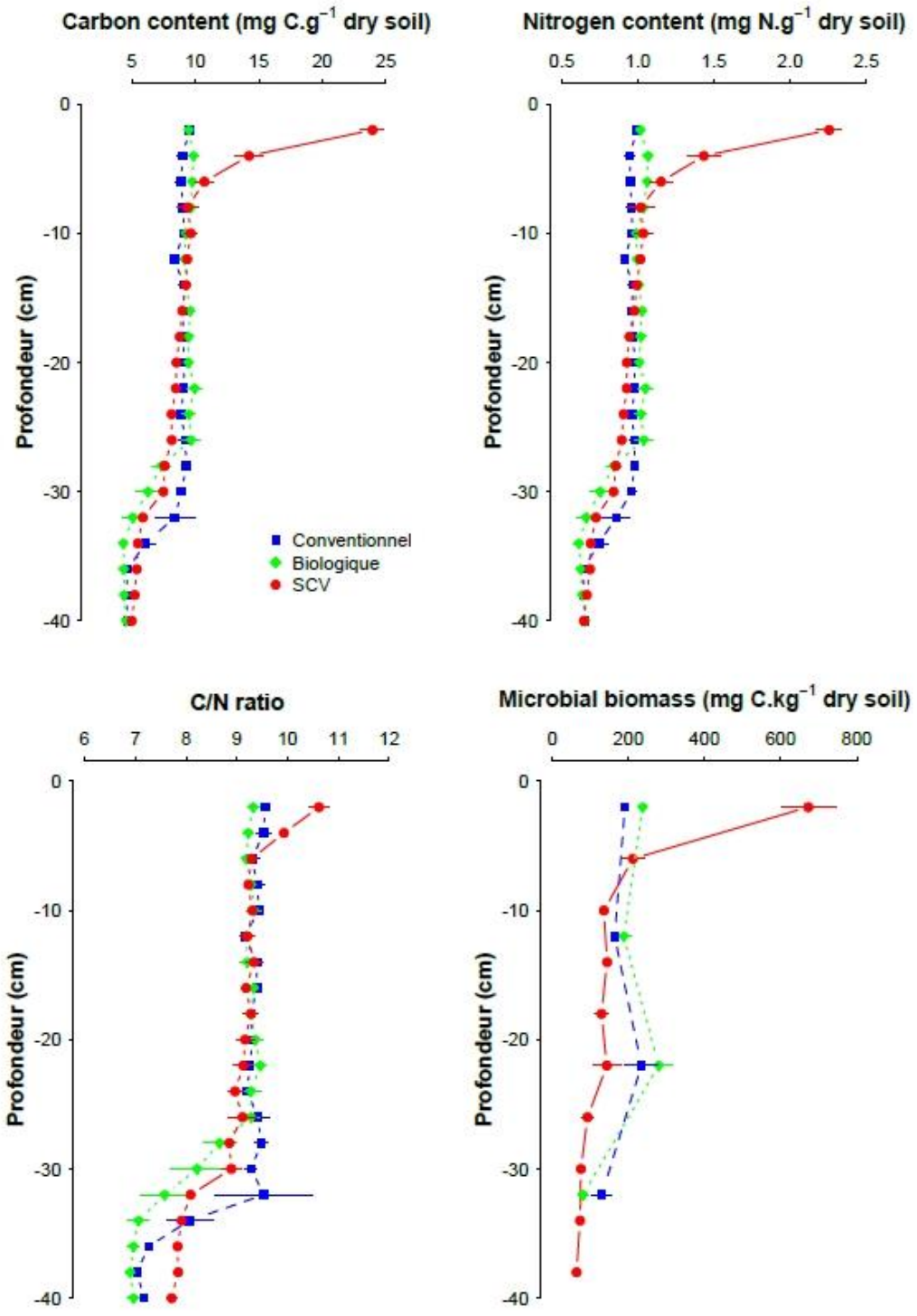


Figure 8 - Profils des teneurs en carbone, azote, rapport C/N et biomasse microbienne des sols de la Cage sous trois des différents systèmes de culture : conventionnel (en bleu), en agriculture de conservation (SCV en rouge) et biologique (en vert). D'après Juarez (2013).

2.3. Courbes de rétention en eau des sols CONV et SCV

Des courbes de rétention en eau des sols de la saturation jusqu'à pF3,5 ont ensuite été réalisées sur des agrégats (2-5 mm) des deux sols (avec 3 réplicats) et les résultats sont présentés dans la figure 9. Ceux-ci ont été placés à une densité apparente proche de 1,2 $g.cm^{-3}$ dans une nacelle en PVC dont le fond est constitué d'une toile fine laissant passer l'eau et retenant les agrégats puis mis à saturation par remontée capillaire pendant 2 jours. Les nacelles sont ensuite placées sur des plaques poreuses préalablement enduites de kaolinite et disposées dans une presse de Richards à des pressions croissantes avec pesées entre chaque nouvel ajustement de pression afin de suivre la désaturation en eau en fonction du potentiel matriciel atteint à une pression donnée.

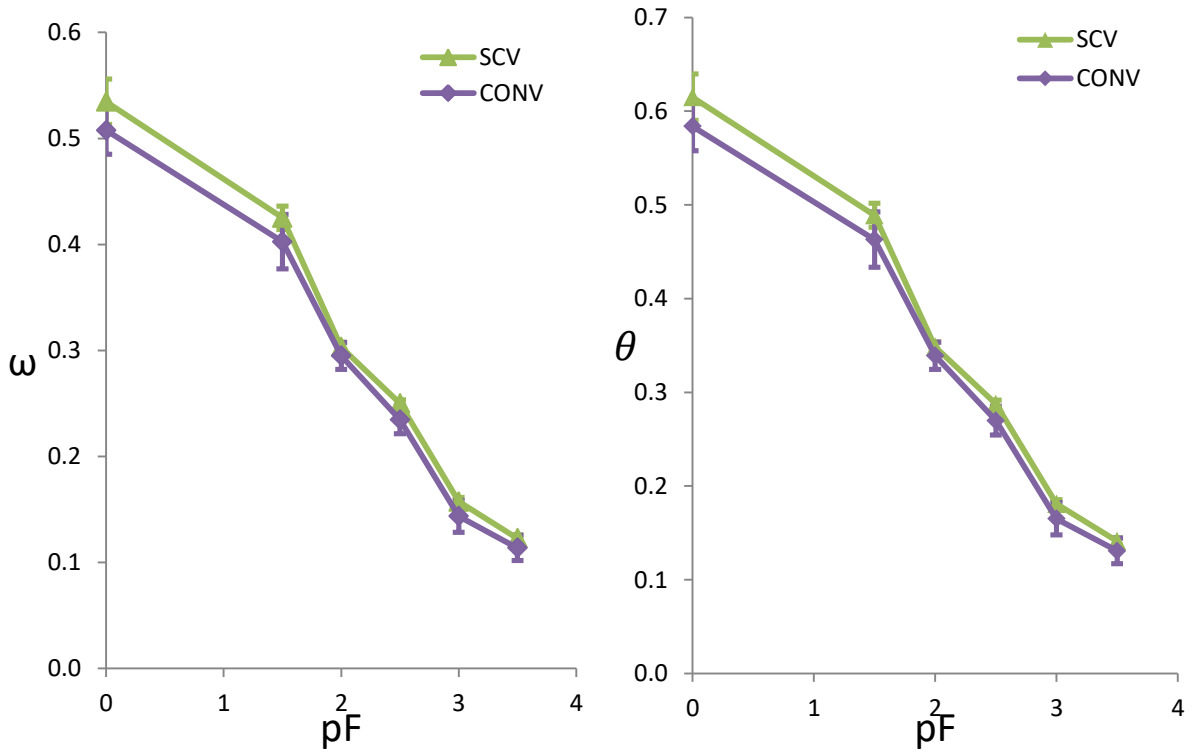


Figure 9 - Courbes de rétention de ω, la teneur en eau massique ($g.g^{-1}$) à gauche et de θ, la teneur en eau volumique ($cm^3.cm^{-3}$) à droite (en eau pour le sol en pratique conventionnelle (CONV-violet) et en agriculture de conservation (SCV -vert). Les barres correspondent à l'écart type de 3 réplicats.

Aucune différence significative n'a été observée entre les deux courbes et donc entre les deux systèmes de culture pour les agrégats de 2-5 mm de diamètre. La porosité intra-agrégats ne

semble a priori pas influencée par les différences de pratique.

2.4. Analyse de la porosité des sols par tomographie aux rayons X

Des acquisitions en tomographie des rayons X ont été réalisées sur les deux sols CONV et SCV par le département des sciences du sol de l'université de Kassel en Allemagne avec une résolution de 40,075 µm (figure 10).

Le volume poral cumulé occupé par les pores selon leur taille au-delà de 40 µm (24,7% et 25.3% du volume total du cosme respectivement en CONV et SCV) n'a pas permis de différencier le sol soumis aux deux pratiques culturales étudiées (figure 11). La résolution ne nous permet pas de conclure quant à la porosité inférieure à 40 µm.

Cette analyse qui prend en compte le volume de pores inter-agrégats, nous a néanmoins permis de conclure que la structure des sols dans les réplicats était similaire, les écarts types entre réplicats étant faibles.

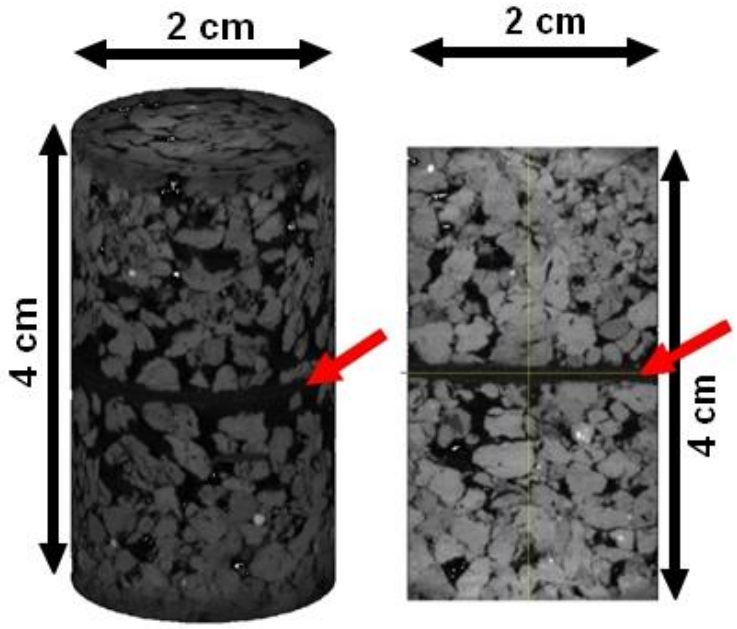


Figure 10 - Images obtenues d'un cosme en tomographie des rayons X en 3D (à gauche) et selon une coupe longitudinale (à droite). Les zones sombres correspondent aux zones de vides (pores) et les zones grises aux agrégats de sol. La bande noire au centre des images correspond à la couche de résidus apportée (flèches rouges).

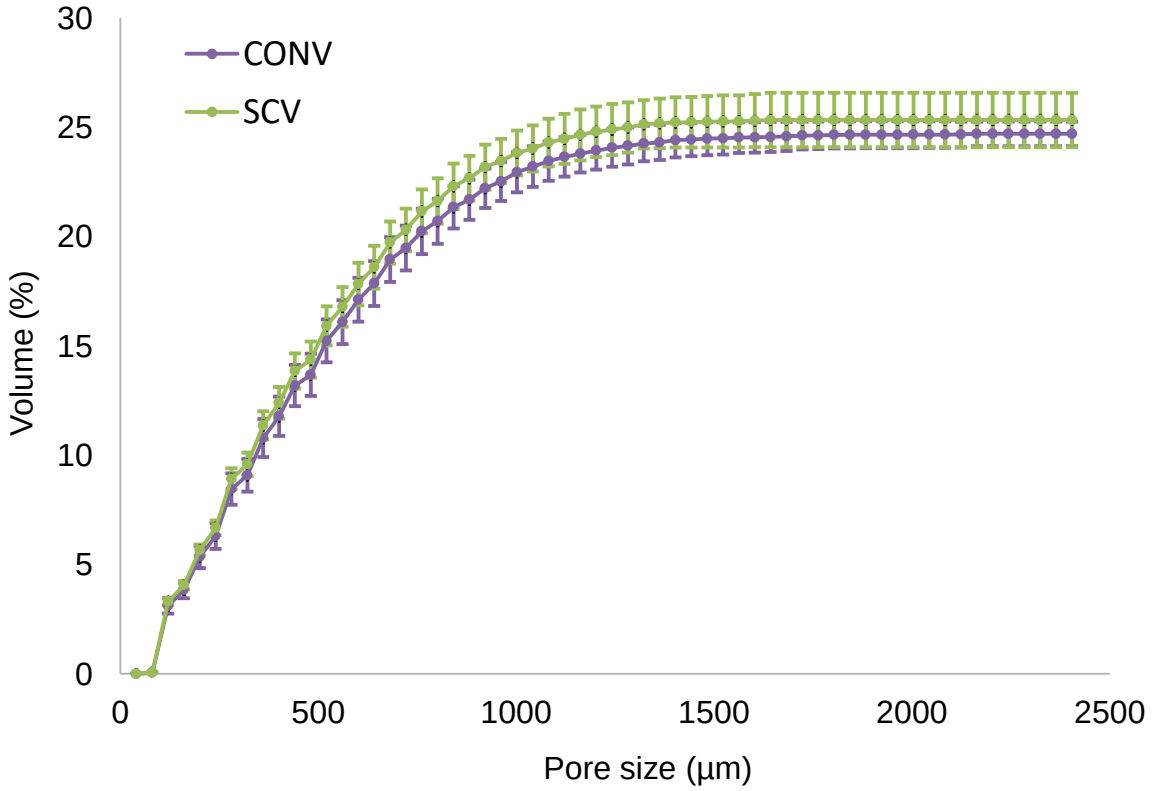


Figure 11 - Courbes du volume de pores cumulé occupé dans le sol selon leur taille sous pratique conventionnelle (violet) et en agriculture de conservation (SCV vert). Les barres correspondent à l'écart type de 3 réplicats.

2.5. Suivi de minéralisation des sols CONV et SCV après apport de résidus marqués

Le suivi de la minéralisation totale (figure 12) montre une différence significative de la minéralisation du carbone en fonction du potentiel matriciel des cosmes mais pas de différence significative entre les deux systèmes de culture sauf à pF3,5 à partir de 30 jours d'incubation. Les résultats sont similaires si on distingue la minéralisation du C issu des résidus apportés (sauf à pF1,5 à partir de 10 jours d'incubation) (figure 13) et du C du sol (sauf à pF3,5 à partir de 3 jours d'incubation) (figure 14).

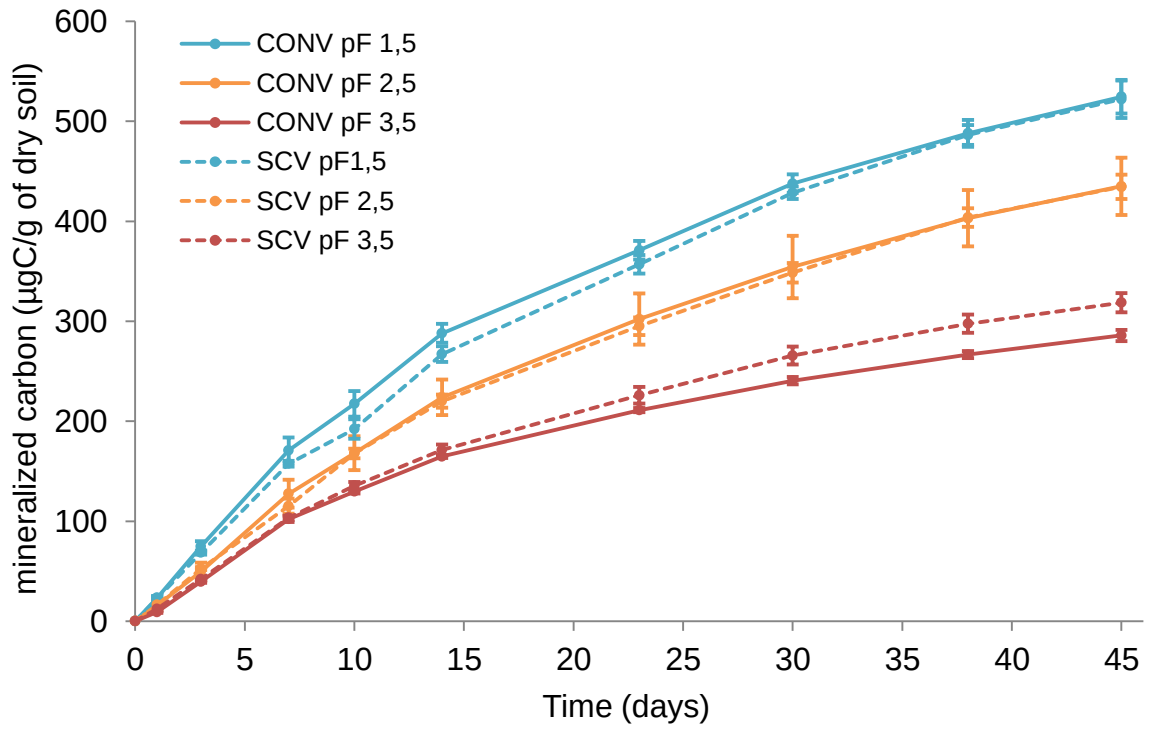


Figure 12 - Cinétiques de minéralisation du carbone total du sol en système conventionnel (CONV-traits pleins) et en agriculture de conservation (SCV-trait pointillés) amendé en résidus, pendant 45 jours. Les barres correspondent à l'écart type de 3 réplicats.

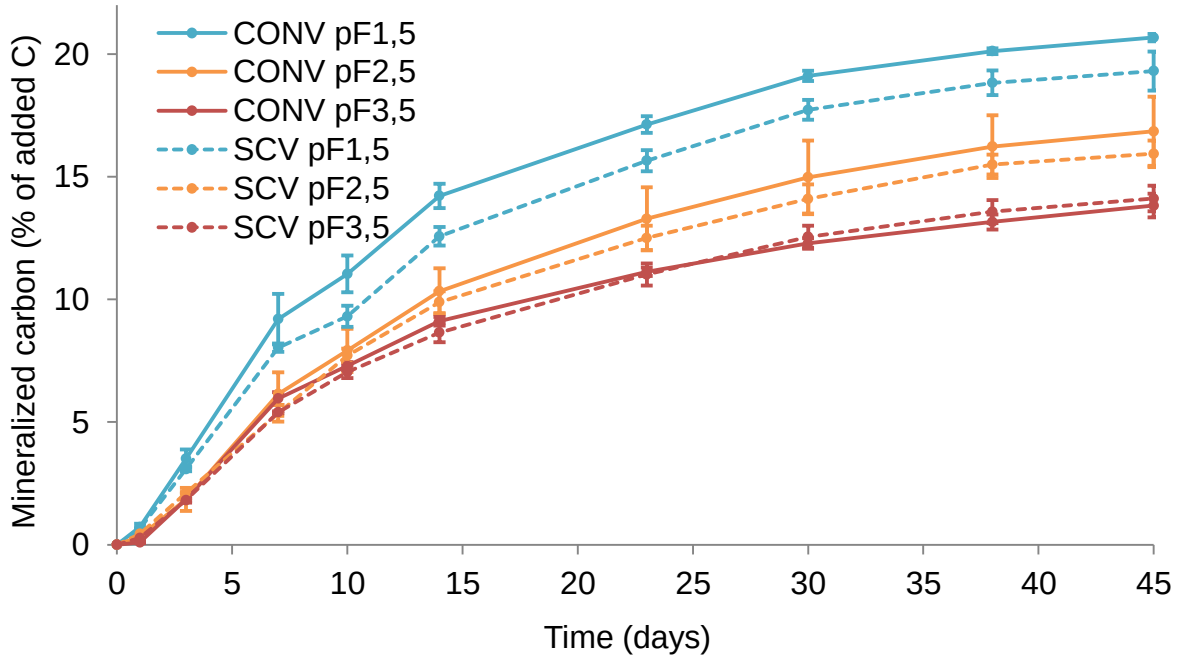


Figure 13 - Cinétiques de minéralisation du carbone issu des résidus (13C-CO2) dans le sol en système conventionnel (CONV-traits pleins) et agriculture de conservation (SCV-trait pointillés) pendant 45 jours. Les barres correspondent à l'écart type des réplicats.

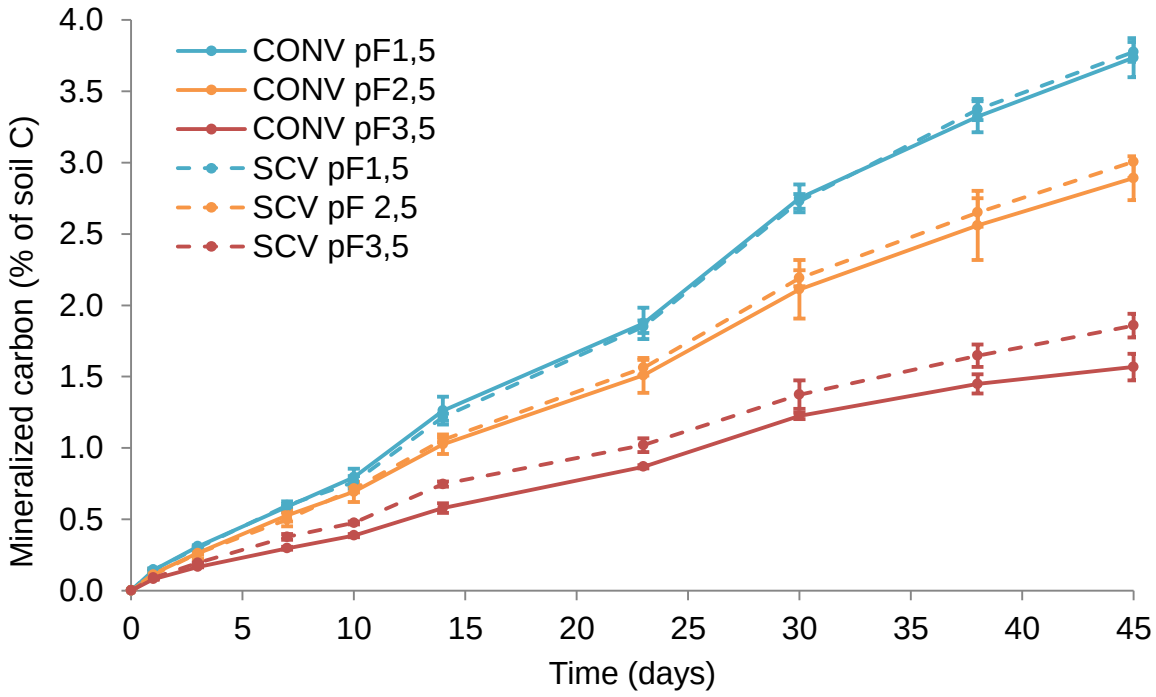


Figure 14 - Cinétiques de minéralisation du carbone du sol en système conventionnel (CONV-traits pleins) et agriculture de conservation (SCV-trait pointillés) amendé en résidus pendant 45 jours. Les barres correspondent à l'écart type des 3 réplicats.

En conclusion, notre hypothèse de départ, à savoir qu'un sol cultivé en système conventionnel ou en agriculture de conservation présenterait des caractéristiques porales intra-agrégats différentes, n'a pas été vérifiée. A partir de là, nous avons choisi de ne travailler qu'avec une seule des 2 modalités testées. Les sols en système conventionnel étant de manière générale largement plus étudiés, nous avons choisi de conserver le sol cultivé en agriculture de conservation sous couvert végétal pour la suite de la thèse.

2.6. Comment ajuster le potentiel matriciel des cosmes ?

Pour ajuster le degré de saturation des pores, les cylindres de sol ont été équilibrés à 3 potentiels hydriques contrastés (pF1,5 ; 2,5 et 3,5) qui ont été choisis à partir des courbes de rétention en eau décrites précédemment.

L’ajustement de la teneur en eau des agrégats a nécessité également des mises au point méthodologiques compliquées. Plusieurs méthodes ont été testées :

- les tables de succion
- la ré-humectation des agrégats par vaporisation
- les presses de Richards

Les tables de succion fonctionnent à l’aide de bacs remplis de sable sur lesquels sont déposés les échantillons préalablement saturés par remontée capillaire. Une dépression d’eau est appliquée par-dessous à l’aide d’un deuxième contenant relié au bac par un « système en U » et dont la hauteur est ajustable. Ainsi, pour atteindre un pF de 1,5, la hauteur doit être de -31,6 cm de hauteur d’eau et pour un pF de 2, la hauteur doit être de -100 cm. Cette méthode n'est en revanche pas utilisable pour équilibrer des sols à pF2,5 (-316,2 cm de hauteur d’eau) et 3.5 (-3162,3 cm de hauteur d’eau) (figure 15).

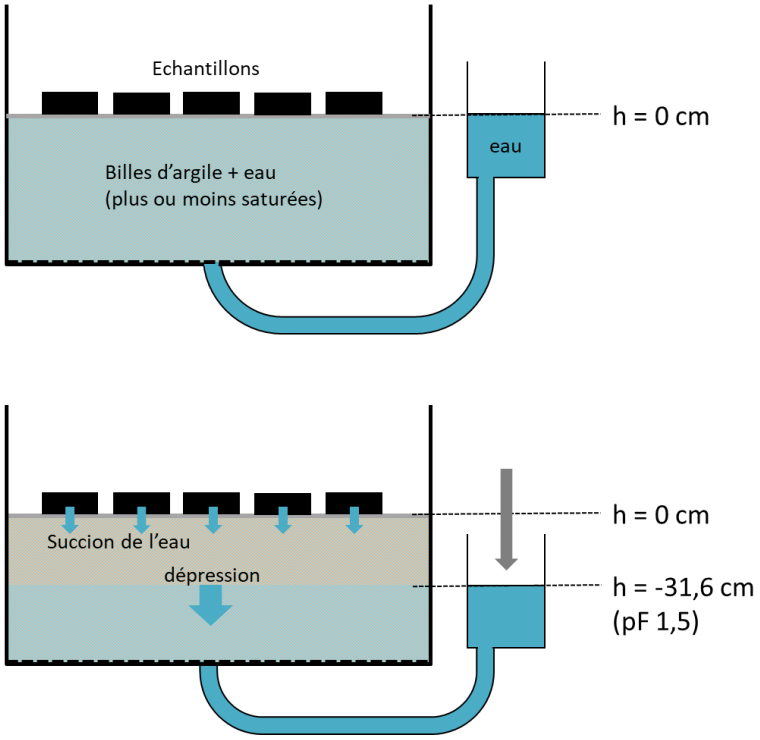


Figure 15 - Schéma du fonctionnement des tables de succion

Nous avons donc choisi dans un premier temps d'utiliser cette méthode pour équilibrer les échantillons de sol à pF1,5 et pF2,5 (mise à l'équilibre des échantillons à pF2 puis séchage des cosmes jusqu’à pF2,5). Mais la durée nécessaire pour atteindre l'équilibre aux 2 pF était très

variable d'un échantillon à un autre et ce, pour un même pF, et aurait pu avoir des impacts ultérieurement sur les mesures de minéralisation des résidus. Nous avons donc éliminé cette méthode par la suite.

La ré-humectation lente et régulière des agrégats a tout d'abord été testée par vaporisation directement sur les agrégats avec de l'eau du robinet jusqu'à atteindre la teneur en eau souhaitée. Les cosmes ont ensuite été construits dans les tubes PVC à partir des agrégats réhumectés avant d'être compactés pour atteindre une densité de 1,3. Cette méthode a été testée pour les pF1,5 et 2,5. La ré-humectation est, pour les deux pF, simple et efficace. Cependant, la compaction des cosmes à pF1,5 génère des pertes de sol et d'eau importantes (figure 16). La méthode n'a donc au final été conservée que pour pF2,5 et 3,5.



Figure 16 - Etat du demi-cosme après mise à l'équilibre des agrégats à pF1.5 puis compaction. On constate les pertes d'eau et de sol par-dessous et la mauvaise tenue des agrégats et de leur structure.

Pour la mise à pF1,5, nous avons décidé de tester la méthode par vaporisation mais cette fois-ci après avoir construit les cosmes dans un premier temps. L'eau était vaporisée progressivement par la surface du cosme. Cette méthode de ré-humectation n'a pas été plus satisfaisante que la précédente générant une croute de surface et un lessivage des particules fines vers le fond du cosme (figure 17). La méthode a par conséquent été abandonnée.



Figure 17 - Etat d'un demi-cosme après compaction puis mise à l'équilibre à pF1,5 par vaporisation. On constate la formation d'une croute en surface et la mauvaise tenue des agrégats de surface et de leur structure.

Pour finir, nous avons décidé d'utiliser les presses de Richards pour la mise à l'équilibre à pF1,5. Ainsi, les demi cosmes ont été construits à partir des agrégats à la teneur en eau de prélèvement avant d'être compactés, saturés en eau (du robinet) et placés dans des presses de Richards sous une pression de -0,0031 MPa pendant 2 jours. Cette méthode s'est avérée concluante.

Au final, différentes méthodes ont été mises en place pour atteindre les 3 potentiels matriciels. Pour pF3,5 la méthode de ré-humectation par vaporisation directe des agrégats peut être utilisée mais dans notre cas, la teneur en eau initiale des agrégats était déjà à la bonne valeur. Les agrégats n'ont donc pas subi de traitement préliminaire avant la construction des cosmes. A pF2,5 ont été ré-humectés par vaporisation directe avant construction des demi cosmes et compaction. Enfin pour les agrégats à pF1,5, nous avons utilisé les presses de Richards.

2.7. Comment procéder à la découpe des cosmes ?

Les découpes millimétriques des cosmes ont nécessité la fabrication d'un dispositif particulier de découpe (figure 18). En effet, à pF3,5 les agrégats, très secs, se décollent facilement les uns des autres et le cosme devait rester à plat et ne pas être renversé afin d'éviter qu'il ne s'écroule. Un système de cales de 2 mm à glisser sous le cosme a été mis en place. Chaque cale soulève les agrégats de 2 mm au-dessus du tube PVC et on peut récupérer les agrégats qui dépassent à l'aide d'une raclette. Glisser une deuxième cale permet d'obtenir les 2 mm suivants et ainsi de suite (figure 18).

La méthode doit être appliquée précautionneusement à pF1,5 pour ne pas écraser le sol, très déformable.

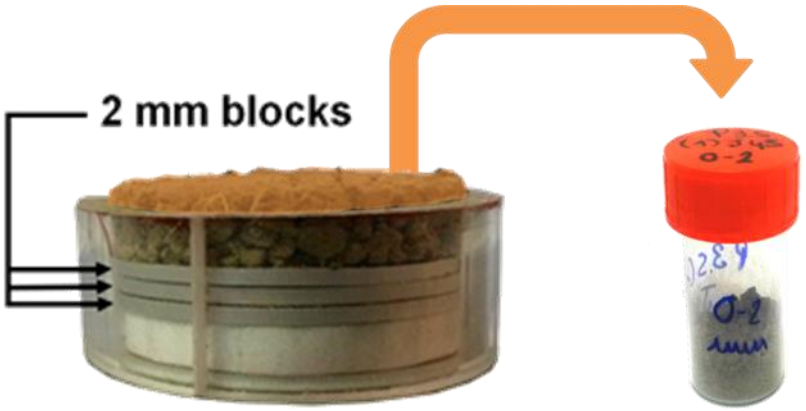


Figure 18 - Dispositif de découpe millimétrique des cosmes avec les cales de 2 mm visibles sur un modèle transparent.

2.8. Conclusion

La comparaison des courbes de rétention en eau, de la porosité par tomographie aux rayons X et la minéralisation du C du sol et des résidus a montré que les sols cultivés en système conventionnel et en agriculture de conservation prélevés entre 5 et 10 cm de profondeur présentaient des caractéristiques similaires et qu'il n'était donc pas pertinent de travailler par la suite avec ces 2 sols. Nous avons donc choisi de continuer à travailler avec le sol cultivé en agriculture de conservation, ce système étant moins étudié que le système conventionnel.
Les mises au point méthodologiques pour ajuster les potentiels hydriques et les systèmes de découpe ont permis de mettre en place un dispositif standardisé et reproductible (structure du sol, teneur en eau, épaisseur des tranches de sol) permettant de multiplier les expérimentations et tester les facteurs souhaités.

Chapitre 3 : Evolution spatio-temporelle de hot-spots de détritusphere à différentes teneurs en eau du sol

Chapter 3: Spatial and temporal evolution of detritusphere hotspots at different soil moistures

Published in Soil Biology and Biochemistry (Védère et al., 2020)

Védère, C., Vieublé Gonod, L., Pouteau, V., Girardin, C., Chenu, C., 2020. Spatial and temporal evolution of detritusphere hotspots at different soil moistures. Soil Biol. Biochem. 150, 107975. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107975

3. Spatial and temporal evolution of detritusphere hotspots at different soil moistures

Védère Charlotte[a], Vieublé Gonod Laure[a], Pouteau Valérie[a], Girardin Cyril[a], Chenu Claire[a].
[a] UMR Ecosys, INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Thiverval Grignon, 78850, France

3.1. Introduction

Soil is a heterogeneous and complex environment with a heterogeneous spatial distribution of native and exogenous soil organic matter (OM) at different spatial scales (from m to µm) (Chenu and Plante, 2006; Peth et al., 2014) as well as of microorganisms (Chenu et al., 2001; Ranjard and Richaume, 2001; Chenu and Stotzky, 2002; Raynaud and Nunan, 2014). Beare et al. (1995) defined soil as the juxtaposition of microenvironments that may harbour different microbial communities and that are characterized by contrasting physical, chemical and physico-chemical conditions. These microenvironments (rhizosphere, porosphere, detritusphere, etc.) are microbial hotspots, i.e., small volumes of soil with much faster process rates and much more intensive interactions between microorganisms and their environment than those of the average soil conditions (Kuzyakov and Blagodatskaya, 2015). The detritusphere corresponds to plant residues and soil in their vicinity where microbial activities are stimulated (Gaillard et al., 1999; Kandeler, 1999). The number of hotspots and characteristics and process rates in microbial hotspots determine process rates at the macroscale (Kuzyakov and Blagodatskaya, 2015). A new generation of soil organic carbon dynamics models explicitly takes soil spatial heterogeneity and soil structure into account to obtain relatively accurate predictions (Vogel and Roth, 2001; Monga et al., 2014; Portell et al., 2018). These models are not yet widely used because they require suitable knowledge of the spatial and temporal distribution of soil microbial hotspots (Moyano et al., 2013).

When fresh OM is added to soil, microorganisms located on the OM itself and in its vicinity are involved in its biodegradation, directly by assimilating soluble C or indirectly by producing extracellular enzymes. The detritusphere has previously been studied in incubation experiments with additions of localized organic substrates, mainly labelled complex plant residues of various biochemical qualities (sup mat, Table 2). It has been established that the biodegradation of plant residues takes place over an area of a few millimetres around the

residues under diffusive conditions (Gaillard et al., 1999; Kandeler, 1999; Gaillard et al., 2003; Poll et al., 2006) and over larger distances in advective conditions (Poll et al., 2006). Similar orders of magnitude were observed with a soluble herbicide (Pinheiro et al., 2015, 2018). Some studies considered that the thickness of the detritusphere was the maximal distance to which any of the considered variables was significantly different from its value in the bulk soil, while others defined it using a breakpoint in the gradient (Kandeler, 1999). The results also depend on the methods used. Generally, thicknesses determined from measurements of enzymatic activities were smaller than when residue-derived ^{13}C or microbial abundances were quantified (Gaillard et al., 1999; Kandeler, 1999; Poll et al., 2006). Incubation conditions in these studies were variable, most of them being performed under diffusive conditions, under moisture conditions ranging from pF 1.8 (-0.0063 MPa) to pF 2.9 (-0.08 MPa). Soil moisture is a key factor modulating such transfers in soil, i.e., the diffusion or advection of soluble substrates, the diffusion of gases, and the movement and activity of microorganisms in soil (Ranjard and Richaume, 2001; Ekschmitt et al., 2008; Moyano et al., 2013; Kuzyakov and Blagodatskaya, 2015). The thickness of the detritusphere was found to increase with soil moisture (Poll et al., 2006), presumably because of facilitated diffusion of soluble compounds from the residues into the soil, but no study has been performed under dry conditions.

The objectives of this work were therefore to quantify the volumes of soil involved in the biodegradation of plant residues and to determine to what extent this volume was affected over time by soil moisture, especially when the soil moisture was low, under diffusive conditions. We hypothesized that at a low soil moisture, fungi are more adapted than bacteria because of the hyphal network that facilitates access to water and nutrients (Chowdhury et al., 2011; Reichardt et al., 2001). Thus, higher fungi/bacteria ratios should be observed at low soil moisture and lead to an increase in the size of the detritusphere by translocation of organic matter through fungal hyphae.

To meet these objectives, soil cores constructed from size-sorted aggregates with localized additions of ^{13}C-enriched maize residues were incubated under laboratory conditions at 3 different matric potentials, and the dynamics of total C and ^{13}C and total and degrading microorganisms were studied at the mm-cm scales over time.

3.2. Materials and Methods

3.2.1.Experimental site and soil sampling

The experimental site was the long-term trial of "La Cage", based in Versailles (France), including plots managed under conservation agriculture without tillage and with a permanent plant cover (fescue or alfalfa) eliminated before the establishment of the main crop (with residue restitution at the soil surface). The soil is a Luvisol (WRB) containing 150 g kg^{-1} clay, 173 g kg^{-1} fine silt, 303 g kg^{-1} coarse silt, 312 g kg^{-1} fine sand and 64 g kg^{-1} coarse sand (Autret et al. 2016).

The soil was sampled in June 2017 from between 5 and 10 cm below the surface. The soil water content at the time of sampling was 124 g kg^{-1}. Aggregates between 2 and 5 mm in diameter were selected by sieving and stored at 4°C until use. This fraction of soil had a carbon content of 13.5 g kg^{-1} and a nitrogen content of 0.95 g kg^{-1}.

3.2.2.Crop residues

Inflorescences of dry maize labelled with ^{13}C ($\delta^{13}C$ = 1947.1 ‰) and supplied by S. Recous (INRAE, Reims) contained 410 g kg^{-1} carbon and 21.2 g kg^{-1} nitrogen (C/N = 19.6). The residues were ground to particle sizes between 0.2 and 2 mm. Residues were composed of 22.8±2.4% soluble organic compounds, 41.6±2.4% hemicellulose, 31.8±1.5% cellulose and 3.9±0.1% lignin and cutin (van Soest fractioning).

3.3.3. Core design

Cores were prepared in 2 stages. First, two PVC cylinders drilled to allow for air to circulate were filled with 66.31 g (dry equivalent) of aggregates (2-5 mm) and compacted using a mechanical press at a bulk density close to that of the sampled soil, i.e., 1.3 g cm^{-3}. The two cylinders were then stacked on each side of two stainless steel 200 µm meshes between which the residues were placed as a homogeneous layer (Fig. 6, chapter 2). The cores initially contained 0.166 g of residues for 132.62 g of dry soil, i.e., 0.52 g $C_{(residues)}$ kg^{-1} dry soil. Each final core measured 57 mm in diameter and 40 mm in height. Control cores without residues were also produced.

Aggregates were equilibrated at three different matric potentials equivalent to pF 3.5 (-0.3 MPa, pores with neck diameters <1 µm filled with water), pF 2.5 (-0.03 MPa, pores with neck diameters < 10 µm filled) and pF 1.5 (-0.0031 MPa pores with neck diameters <100 µm filled). Water contents of aggregates were adjusted before construction of the cores for the pF 2.5 and 3.5 groups and after construction of the cores for the pF 1.5 group. The corresponding water contents at pF 2.5 and 1.5, determined from water retention curves (sup mat Fig. 27), were 251 and 426 g of water per kg soil, respectively. The moisture at pF 3.5 corresponded to the initial water content of the sampled soil, i.e., 124 g kg^{-1} soil. The matric potential of pF 2.5 was adjusted by adding water to increase the soil moisture from 124 g kg^{-1} soil to 251 g kg^{-1} soil. To reach a pF of 1.5, the aggregates were placed in the cylinders on a porous pressure plate, i.e., a chamber allowing for the application of a controlled pressure on saturated samples to adjust their matric potential (Klute, 1986), at -0.0031 MPa. This method avoided manipulating the highly deformable aggregates at pF 1.5. We assumed that the system was under diffusive conditions only.

Each core was then placed in a 1 L air-tight jar (equipped with a septum allowing for gas sampling) on a nylon support allowing for air circulation all around the core. The water content was kept constant, with 10 mL of water placed at the bottom of the jar and the core moisture adjusted if necessary on the basis of regular weighing. In preliminary experiments, we checked that the soil water content was similar on both sides of the residue layer throughout the incubation. The atmosphere was regularly renewed (with CO_2-free air rewetted by bubbling in a water flask). The jars were incubated in the dark at 20°C for up to 45 days.

A set of 21 cores (4 cores with residues and 3 control cores without residues for each of the 3 matric potentials) was prepared for monitoring the total C and ^{13}C mineralization. For analyses of soil C contents (total and ^{13}C) and soil phospholipid fatty acids (PLFAs) (total and ^{13}C) on a mm scale, requiring destructive samples, 36 additional cores with residues were prepared with 3 replicates per matric potential and per date of analyses (4 dates). All the cores for mineralization monitoring and destructive sampling were prepared and incubated identically.

3.3.4. Mineralization measurements

Organic carbon mineralization was regularly monitored for 45 days, with measurements on days 1, 3, 7, 15, 21, 28, 35, 42 and 45. Total CO_2 was measured directly

from the jars using a gas chromatograph (Agilent, 490 Micro GC System, CA, USA), and its concentration, obtained in ppm, was converted to µg $C\text{-}CO_2$ g^{-1} dry soil following the relation:

(1) $C\text{-}CO_{2\ (total)} = (CO_{2\ (total\text{-}ppm)} / m_{\ dry\ soil}) \times \rho C$

where $CO_{2\ (total\text{-}ppm)}$ is the content of total CO_2 in ppm, $m_{\ dry\ soil}$ is the mass of dry soil of the core in g, and ρC is the density of carbon (0.5 $\mu g.\mu L^{-1}$, according to the ideal gas law at 20°C). This calculation was performed for a volume of air of 1 L (we neglected the volume of the cosm in the calculation).

For $^{13}C\text{-}CO_2$ measurements, gas was sampled from the jars, transferred to a glass bottle under vacuum and analysed the same day. $^{13}C\text{-}CO_2$ was measured with a gas chromatograph (5890 GC Hewlett-Packard, CA, USA) coupled with an isotopic mass spectrometer (Isochrome III, Optima, Micromass-GVI Ltd, Manchester, UK). The ^{13}C signature of the residues was measured on dry, ground residue aliquots using an isotopic mass spectrometer (Precision, Elementar UK Ltd, Cheadle, UK). The measured $\delta^{13}C$ of the atmosphere of the jars with cores containing residues ($\delta_{measured}$), of the residues ($\delta_{residues}$) and of the CO_2 evolved from control cores (δ_{SOM}) were expressed in ‰ relative to Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB), and the $\%_{residues}C$ of each sample gas measurement was obtained using the relation:

(2) $\%_{residues}C = (\delta_{measured} - \delta_{SOM}) / (\delta_{residues} - \delta_{SOM})$

The quantity of $C\text{-}CO_{2\ (residues)}$ in µg $C\text{-}CO_2$ g^{-1} dry soil was then obtained by the relation:

(3) $C\text{-}CO_{2(residues)} = C\text{-}CO_{2\ (total)} \times \%_{residues}C$

3.3.5.Core slicing

To analyse the detritusphere soil, the 2 cylinders of soil constituting the cores were separated from the meshes containing the residues, and the remaining residues between the two meshes were removed and stored at -20°C before lyophilization. Slices 2 mm thick were cut out of the 2 cylinders of each core from the residue bed (6.63 g of dry soil per slice). Thus, 4 samples corresponding to 0-2 mm, 2-4 mm, 4-6 mm and 12-14 mm (as distant soil) away from the residues were obtained. The slices of the 2 cylinders corresponding to the same sampling distances were pooled to increase the soil mass available

for analysis and stored at -20°C before lyophilization.

3.3.6. Analyses of ^{13}C content of residues and soil

^{13}C contents in residues and in the different slices of soil were analysed at different sampling times using an elemental analyser (Vario Isotope Select, Elementar, Hanau, Germany) coupled to an isotopic mass spectrometer (Precision, Elementar UK Ltd, Cheadle, UK). The ^{13}C contents of the intermediate soil slices (between 6 and 12 mm) that were not analysed were estimated by linear regression.

3.3.7. PLFAs extraction and analyses

PLFAs analyses were carried out on the 0-2, 2-4, 4-6 and 12-14 mm soil slices after lyophilization. PLFAs were extracted according to the method described by Frostegård et al. (1993). The lipids of the microbial cell membranes were extracted after mixing the soil samples with a mixture of methanol, chloroform and citrate buffer. Then, phospholipids were separated from neutral lipids and glycolipids chromatographically on a silica column. Recovered phospholipids were depolymerized and transmethylated during alkaline methanolysis and stored at -20°C until analyses.

PLFAs were separated using a gas chromatograph with a flame ionization detector (Agilent, 6890 Plus GC, version 1.03.08, Germany). A qualitative standard mixture based on fatty acids (from C11:0 to C20:0) (BAME: bacterial acid methyl ester CP, 47080_U, Sigma Aldrich) was used to identify PLFAs contained in the samples according to their retention time. A second quantitative FAME standard (Supelco 37 component fame mix, CRM47885, Sigma-Aldrich) was used to generate calibration curves and quantify the PLFAs extracted from the samples. The standard nomenclature of PLFAs described in Frostegård et al. (1993) was used. Mono-unsaturated and cyclopropylated PLFAs (C16:1w7c, C18:1w9c, C18:1w9t) were considered markers of gram-negative (gram-) bacteria, iso- and anteiso-PLFAs (iC15:0, aC15: 0, iC16:0) were considered gram-positive bacteria (gram+) markers, and PLFA C18:2w6c was considered a fungal marker (Quideau et al., 2016). The total microbial community (total microbial PLFAs) was expressed by the addition of gram-, gram+, and fungal markers as well as the C14:0, C15:0, C16:0 and C18:0 fatty acids obtained. The

fungi/bacteria ratios (ratios of the fungal marker to the gram+, gram- C14:0 and C15:0 markers) were calculated.

3.3.8. ^{13}C-PLFAs analyses

Analysis of the isotopic composition of PLFAs was carried out on a gas chromatograph (Agilent, 6890A, USA) coupled to an Isochrom continuous flow IRMS (Isochrom-Isoprime, Micromass UK Ltd, Manchester, UK). The fatty acid retention times were determined using the BAME standard (bacterial acid methyl ester CP, 47080_U, Sigma Aldrich) and FAME mixture (Supelco 37 component fame mix, CRM47885, Sigma-Aldrich). ^{13}C values of the methyl esters of individual fatty acids ($\delta_{measured\ PLFA}$) were corrected to remove the value of the methyl group added during the esterification (δ_{methyl} = -65 ‰) (Lerch et al., 2009) according to the following formula:

(4) $\delta_{PLFA} = (\delta_{measured\ PLFA} \times (nC_{PLFA}+1) - \delta_{methyl}) / nC_{PLFA}$.

The measured δ^{13}C of the PLFAs (δ_{PLFA}), of the residues ($\delta_{residues}$) and of control PLFAs ($\delta_{control}$) were expressed in ‰ relative to VPDB, which allowed for calculation of the $\%_{residues}$PLFA of each sample using the relation:

(5) $\%_{residues}PLFA = (\delta_{measured\ PLFA} - \delta_{FAME}) / (\delta_{residues} - \delta_{control})$,

Then, the quantity of labelled PLFAs was determined according to the following formula:

(6) ^{13}C-PLFA = $PLFA_{(tot)} \times \%_{residues}PLFA$.

^{13}C-PLFA was measured only in samples incubated for 7 days at pF 1.5 and 3.5.

3.3.9. Statistical analyses

Normality of the mineralization, ^{13}C in residues and soil, total microbial PLFAs and ^{13}C-microbial PLFAs data sets and the homogeneity of the variances were evaluated with the Shapiro-Wilk test (P> 0.05) and Bartlett test (P> 0.05), respectively. When these two conditions were met, analysis of variance (ANOVA) as well as a Tukey multiple comparison test (with a confidence interval of 5%) were performed. On the other hand, when these two

conditions were not satisfied, a non-parametric Kruskal-Wallis test as well as a Dunn multiple comparison test (with a confidence interval of 5%) were implemented.

Microbial PLFAs corresponding to gram-, gram+ and fungi according to the 3 different matric potentials and to the different slices of soil located at increasing distances from the residues at days 3 and 45 of incubation were compared using PCA. The structure of total and active microorganisms after 7 days of incubation were compared in the same way. Statistics were performed with RStudio version 1.1.463.

3.4. Results

3.4.1. Carbon mineralization

3.4.1.1. Total carbon mineralization

Total carbon mineralization increased with decreasing matric potential (Fig. 19). Cores with residues showed a steep increase in the total carbon mineralization at the beginning of the incubation until day 10 and then a relatively slower increase until day 45, while the increase in control cores was more constant during the whole incubation period. After 45 days, mineralization was 63% greater at pF 1.5 than at pF 3.5 for control soils and 49% greater at pF 1.5 than at pF 3.5 for soil amended with residues.

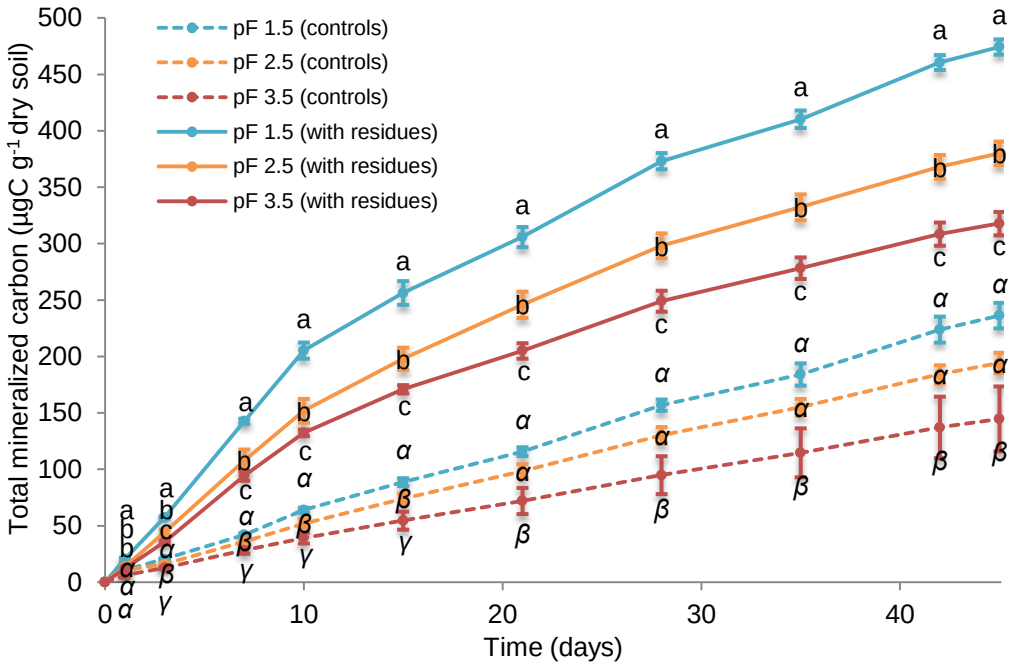
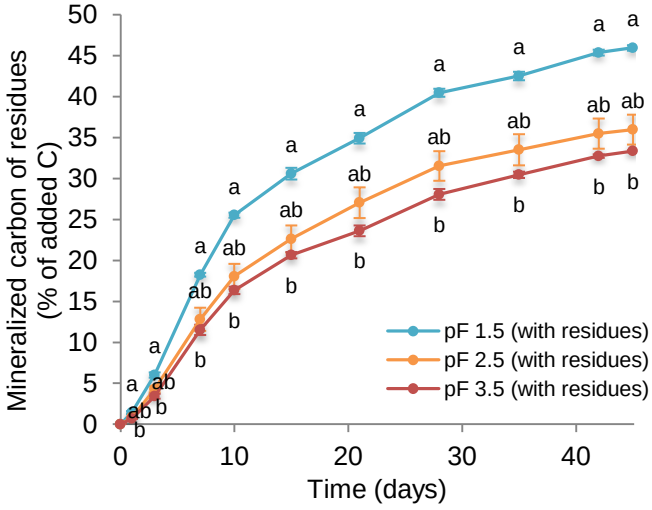


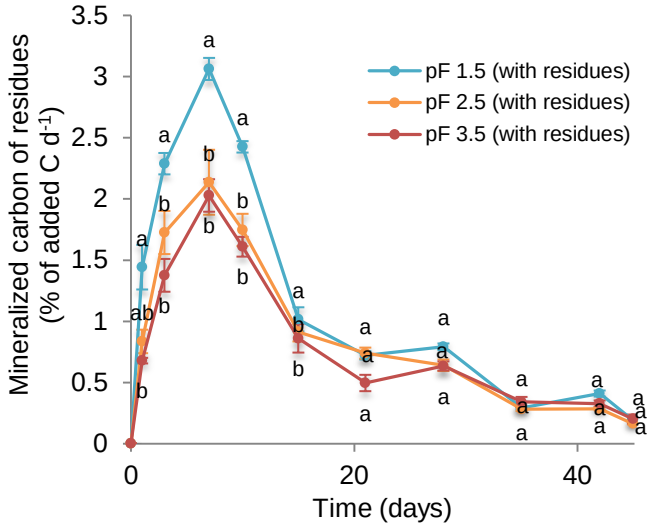
Figure 19 - Kinetics of total carbon mineralization of control soil and soil amended with residues over 45 days. The bars correspond to the standard deviation of the 3 replicates and the letters to the results of the statistical tests (Tukey test) between the 3 pFs for each date and each treatment (controls and amended cores treated separately).

3.4.1.2. *Mineralization of residue-derived carbon*

Cumulative mineralization of the residues showed similar dynamics in the different matric potentials, with very rapid mineralization from the start of incubation eventually slowing down (Fig. 20a). The mineralization of residues increased with increasing moisture. After 45 days, between 33 and 46% of residue-derived C was mineralized. Residue mineralization rates (Fig. 20b) exhibited similar dynamics for the 3 water contents. Mineralization rates were maximum at approximately day 7 of incubation and then decreased rapidly to reach values equal to or lower than 0.2% for the 3 studied matric potentials at day 45 of incubation. Mineralization rates increased with increasing soil moisture only during the first 14 days of incubation.



(a)



(b)

Figure 20 - Kinetics of residues carbon mineralization: cumulative mineralization (a) and daily mineralization (b). In both cases, the bars correspond to the standard deviation of the replicates and the letters to the results of the statistical tests (Dunn test (a) and Tukey test (b)) between the 3 pFs for each date.

3.4.2. The fate of residue C

^{13}C initially originating from the residues was distributed in all 3 compartments over time. A certain fraction of ^{13}C persisted in residues, some was transferred into the soil, and some ^{13}C was mineralized (either from the residue layer itself or after its transfer into the

soil). On the scale of whole cores, ^{13}C balances varied between 76.0% and 96.1% and were adjusted to 100% for comparison.

After 3 days of incubation, more than 80% of ^{13}C remained concentrated in the residue layer. Only a small amount of residue C was mineralized (<10%), and that mineralized at pF 2.5 and 3.5 was significantly less than that mineralized at pF 1.5. Finally, the amount of ^{13}C present in the soil was not significantly different for the 3 matric potentials and accounted for less than 10% of the total ^{13}C content (Fig. 21).

The proportion of ^{13}C in the residue layer relative to the amount of ^{13}C initially added decreased significantly over time. Conversely, the proportion of mineralized ^{13}C increased. Differences in ^{13}C content in the residues and mineralized fractions were significant between pF 1.5 and 3.5 after 15 days of incubation but not between the pF 2.5 and 3.5 groups. In addition, we observed a significant correlation ($R^2 = 0.99$, $P < 0.01$) between the decrease in ^{13}C in the residue layer and the increase in mineralized ^{13}C (sup mat Fig. 28.). ^{13}C increased in soil at the beginning of the experiment until day 7 and was higher in high-moisture soils than in low-moisture soils after 7 days. At the end of the incubation, mineralized ^{13}C represented approximately 10% of the total ^{13}C (Fig. 21).

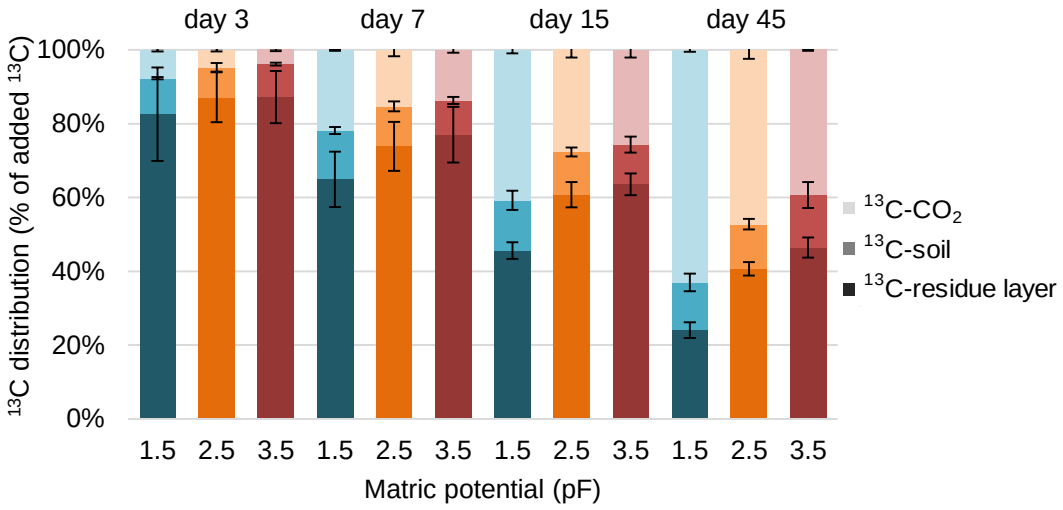


Figure 21 - ^{13}C distribution (% of the added ^{13}C) in the mineralized, soil and residues fractions after 3, 7, 15 and 45 days of incubation for the 3 matric potentials.

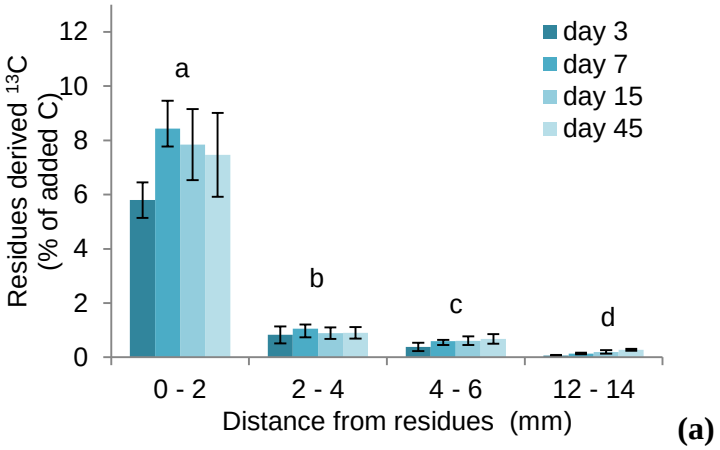
3.4.3. Transfer of residue C in the soil at the millimetre scale

The transfer of ^{13}C into the soil occurred mainly in the first 2 mm, as this distance represented approximately 80% of the total ^{13}C transferred into soil regardless of the sampling date (Fig. 22). At day 7, more ^{13}C had been transferred into the soil at pF 1.5 than at pF 3.5, and the differences were significant. The quantities of ^{13}C present in the soil significantly decreased with increasing distance from the residue layer, but ^{13}C was detected up to 14 mm from the residues (Fig. 22). The quantities of ^{13}C transferred to the 0-4 mm section were not significantly different for the different matric potentials. Beyond 4 mm, the amount of ^{13}C present in soil was significantly higher at pF 1.5 than at pF 3.5, regardless of the date of measurement. Thus, at relatively high soil moisture contents, the ^{13}C from the residues was transferred over relatively great distances in the soil.

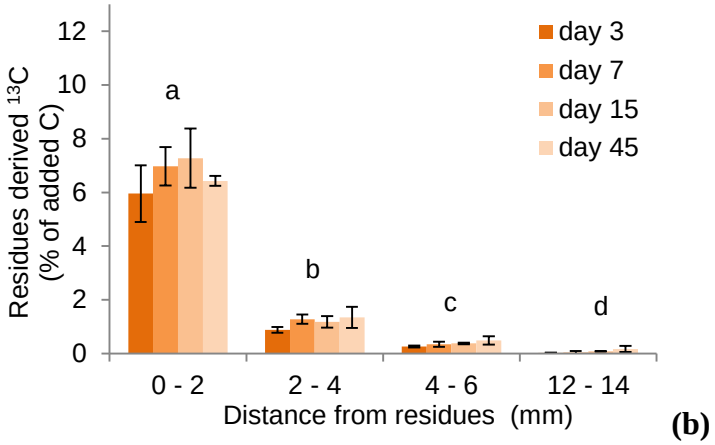
Transfer of ^{13}C into the soil was very rapid and observable within 3 days of incubation, regardless of soil moisture (there was no significant difference between the 3 pF groups). The amount of ^{13}C in the soil was maximal after 7 days of incubation for the pF 1.5 groups (Fig. 22a), after 15 days for the pF 2.5 groups (Fig. 22b) and later for the pF 3.5 groups (Fig. 22c). The transfer of ^{13}C in the soil was hence slower for low-moisture soils than for high-moisture soils. Based on the distribution of ^{13}C observed after 3 days in the soil reaching a distance of 12 mm at pF 1.5 and 2.5, we calculated a minimum transfer rate of 4.6×10^{-6} $cm.s^{-1}$. At pF 3.5, ^{13}C was quantified only up to the third section, which fixed the minimum distance reached at 4 mm, inducing a minimum transfer rate of 1.5×10^{-6} $cm.s^{-1*}$.

* Calculation details: diffusion front found until 0.4 and 1.2 cm after 3 days (259200 sec). Transfer rate = distance (cm) / time (s)

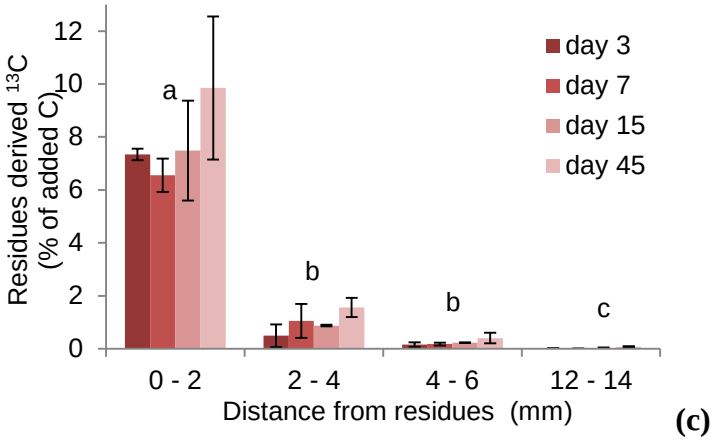
.



(a)



(b)



(c)

Figure 22 - ^{13}C content from residues in different soil slices located at increasing distances from the residues layer (0-2, 2-4, 4-6 and 12-14 mm) after 3, 7, 15 and 45 days of incubation at pF1.5 (a), pF2.5 (b) and pF3.5 (c). The bars correspond to the standard deviation of the replicates and the letters to the results of the statistical tests (Dunn test) between slices 0-2, 2-4, 4-6 and 12-14 mm (all dates combined)

3.4.4. Distribution of total microorganisms

The initial quantities (6 days after matric potential adjustment and before the incubation started) of total microbial PLFAs in aggregates were 11.7±0.5 nmol g^{-1} soil at pF 1.5, 11.5±0.7 nmol g^{-1} soil at pF 2.5 and 8.8±0.9 nmol g^{-1} soil at pF 3.5 (significantly lower than at the other two pFs). Total microbial PLFAs decreased significantly in the soil between day 0 and day 7 but remained stable thereafter (sup mat Fig. 29a). All dates combined, total microbial PLFAs were greater at pF 3.5 than at pF 1.5 and 2.5 (sup mat Fig. 29b). The differences were significant after 7 days of incubation. Total microbial PLFAs were significantly higher near the residues than at greater distances (sup mat Fig. 29c). Gradients were more marked at pF 1.5 and 2.5 than at pF 3.5, where PLFAs were more homogeneously distributed in soil.

After 3 days of incubation, microbial communities were similar for the 3 pF groups (Fig. 23a) but were different between the 2 mm of soil adjacent to residues and the more distant soil, with significantly more fungi and gram- and gram+ bacteria in the vicinity of residues (Fig. 23c). After 45 days of incubation, the difference between microbial communities was greater between groups at pF 3.5 and at the two other matric potentials with significantly more fungi and gram- bacteria at pF 3.5 (Fig. 23b). Microbial communities were different between the first 2 mm and the rest of the soil, with significantly more fungi and significantly fewer gram+ bacteria in the 0-2 mm section than in those beyond 4 mm (Fig. 23d).

Fungi/bacteria ratios from total microbial PLFAs decreased between day 0 and day 3 before increasing again to reach values of 0.029±0.043 at pF 1.5, 0.036±0.052 at pF 2.5 and 0.059±0.058 at pF 3.5 after 45 days of incubation. The ratios were significantly higher at pF 3.5 than at pF 1.5 and pF 2.5 after 45 days of incubation. Finally, the fungi/bacteria ratios also evolved with the distance from residues and significantly decreased between the first two mm of soil (0.062±0.041) and greater distances (with ratios from 0.010±0.015 to 0.016±0.023) (sup mat Figs. 30 and 31).

The fungi/bacteria ratios increased over time in the 0-2 mm section and were higher at pF 3.5 than at pF 1.5 after 45 days (sup mat Fig. 30). Beyond 2 mm, the ratios remained similar over time with no significant difference. However, the fungi/bacteria ratios in soil at distances >2 mm from the residues were significantly higher at pF 3.5 than at pF 2.5 and 1.5,

regardless of the incubation date (sup mat Fig. 31). These variations in the ratios between days 0 and 45 in the first 2 mm of the soil were mainly due to an initial decrease and then significant increase in fungal PLFAs as well as a significant decrease in bacterial PLFAs (sup mat Fig. 32). Overall, the fungi/bacteria ratios were more dependent on the fungal marker content ($R^2 = 0.86$) than on those of bacterial markers ($R^2 = 0.04$).

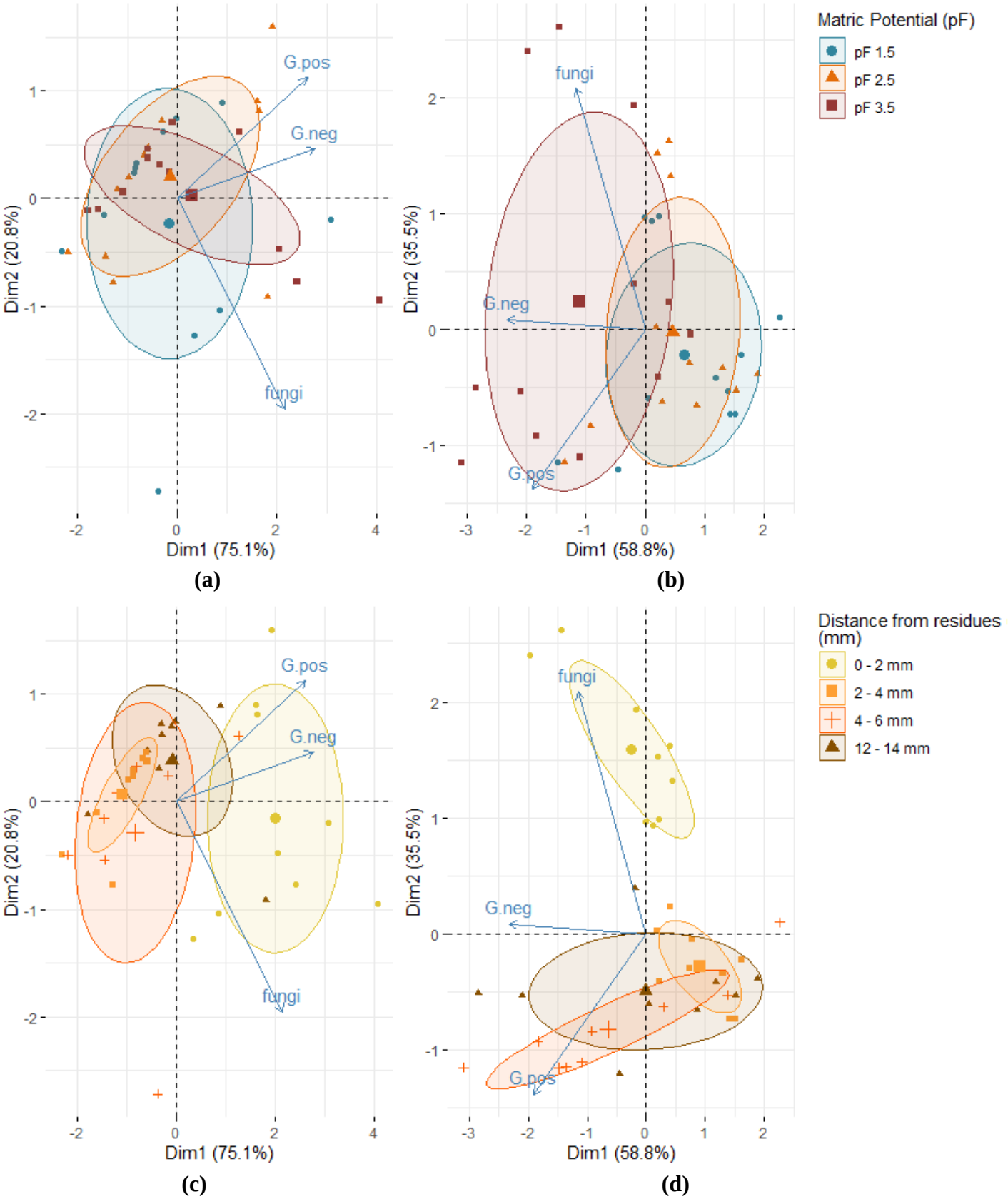


Figure 23 - Principal Component Analysis (PCA) of total microbial PLFAs corresponding to Gram-negative bacteria (G.neg), Gram-positive bacteria (G.pos) and fungi after 3 days (a, c) and 45 days (b, d) of incubation according to the 3 different matric potentials (a, b) and according to different slices of soil located at increasing distances from the residues (c, d).

3.4.5. Distribution of residue C-degrading microorganisms after 7 days of incubation

After 7 days of incubation, total ^{13}C-microbial PLFAs were similar between pF 1.5 and 3.5 (Fig. 24), but we observed some differences between pF 1.5 and 3.5 with more gram+ bacteria at pF 3.5 than 1.5 and conversely more gram- bacteria and fungi at pF 1.5 than 3.5, although none of the differences were significant. The fungi/bacteria ratios of ^{13}C-PLFAs at the core scale were 0.096 at pF 1.5 and 0.037 at pF 3.5. The fungi/bacteria ratios of ^{13}C-PLFAs were thus higher than the ratios calculated from total microbial PLFAs at pF 1.5 and similar to those at pF 3.5.

Total ^{13}C-microbial PLFAs expressed in nmol g^{-1} were significantly more concentrated near the residues than at greater distances regardless of the matric potential but without a significant difference between pF 1.5 and 3.5 (Fig. 24). Thus, 75.4±5.2% and 88.0±8.3% of total ^{13}C-microbial PLFAs were concentrated in the 0-2 mm section at pF 1.5 and 3.5, respectively, and 15.8±2.8% of total ^{13}C-microbial PLFAs were present between 2 and 4 mm at pF 1.5 compared to only 8.7±6.5% at pF 3.5, the differences occurring mainly due to bacteria.

^{13}C-microbial PLFAs represented a decreasing proportion of total microbial PLFAs with increasing distance from the residue layer, with 19.4±2.0% and 13.3±4.4% of the total microbial PLFAs for pF 1.5 and 3.5 at 0-2 mm, 4.7±0.7% and 1.8±0.5% at 2-4 mm, 2.3±0.3% and 0.5±0.1% at 4-6 mm and finally 0.5±0.2% and 0.1±0.04% at 12-14 mm, respectively. In the 0-2 mm zone, 32.6±7.6% of total fungi and 16.8±1.5% of total bacteria had assimilated ^{13}C at pF 1.5 compared to 15.5±4.3% of fungi and 11.9±4.4% of bacteria at pF 3.5 (sup mat Fig. 33 and 34).

Comparing the microbial community structure of total and degrading microorganisms *via* PCA showed that these communities were clearly distinct, regardless of the matric potential (Fig. 25) and the distance to the residues (sup mat Fig. 35). Furthermore, the composition of microorganisms assimilating residue C were much less affected by soil moisture (Fig. 25) than that of the overall microbial community and much more affected by distance to the residues (sup mat Fig. 35).

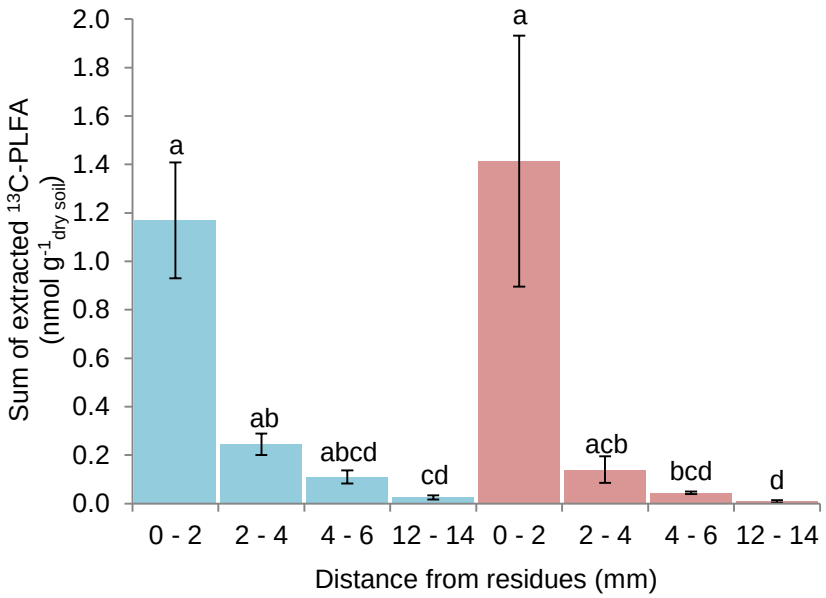


Figure 24 - ^{13}C-PLFA content according to different soil slices located at increasing distances from the residues (0-2, 2-4, 4-6 and 12-14 mm) at pF1.5 (blue) and 3.5 (red) after 7 days of incubation. The letters correspond to the results of the statistical tests (Dunn test).

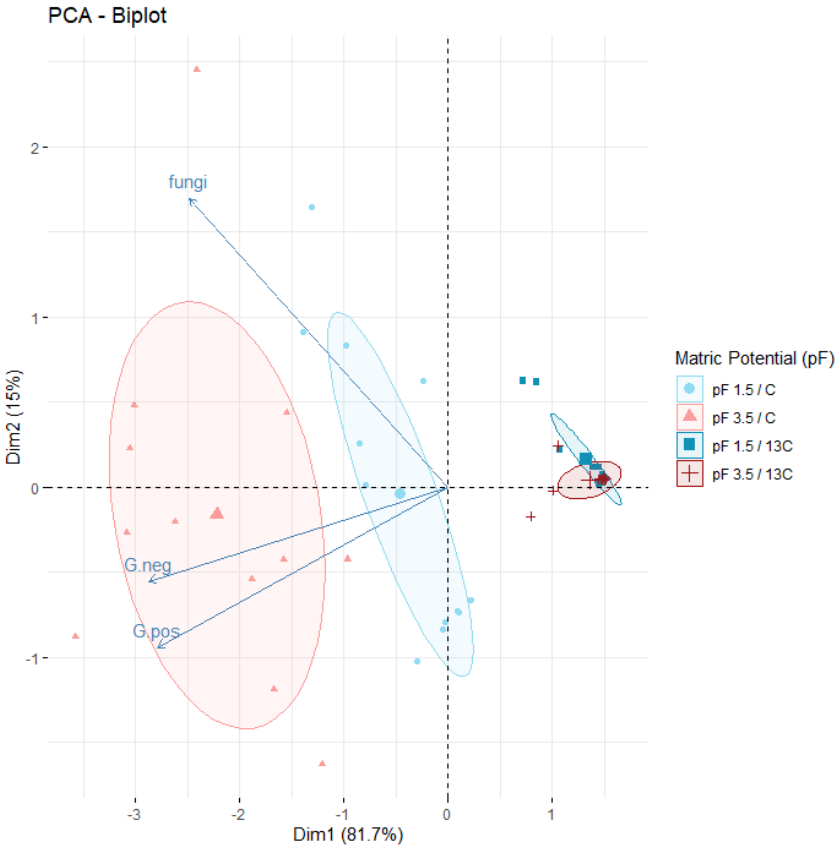


Figure 25 - Principal Component Analysis (PCA) of total PLFA and ^{13}PLFA according to matric potential after 7 days of incubation

3.5. Discussion

3.5.1. Size of the detritusphere

When quantifying ^{13}C in the soil sections, we detected ^{13}C up to 14 mm from the residues, but approximately 80% of the residue C present in soil was within the first 2 mm from the residues. Under diffusive conditions and based on ^{13}C quantification, Gaillard et al. (1999) considered that the detritusphere was approximately 4 millimetres after the addition of wheat straw and 5 mm after the addition of young rye leaves, while Poll et al. (2006) measured a 1.6 mm thickness with maize residues, and Poll et al. (2008) measured 3 mm with rye residues (sup mat, Table 2). These differences likely result from the abundance of the soluble fraction of the residues, susceptibility to diffusion, soil structure and moisture conditions that affected the transfer of soluble C to the soil (diffusion, advection), fungi/bacteria balance and microbial activity. We confirmed that gradients of residue-derived C rapidly were established and persisted over several weeks.

3.5.2. Microbial communities in the detritusphere

Regarding the total microbial community, we found that the 0-2 mm soil zone harboured a distinct microbial community structure with more fungi than the other soil zones. Thus, fungi/bacteria ratios decreased with increasing distance from the residues, as also observed by Poll et al. (2006) and Marschner et al. (2012). Microorganisms present in the 0-2 mm zone probably originated at least in part from the maize residues.

After 7 days of incubation, the ^{13}C microbial community was distinct from the total microbial community and was composed of both bacteria and fungi (Fig. 25). These results are partly contradictory with previous works that showed that during the degradation of plant residues, bacteria were first involved in decomposition, and once soluble C had been assimilated, fungi took over to degrade more complex substrates such as hemicellulose and lignin (e.g., Marschner et al., 2011). Our results are nevertheless more consistent with those of Kramer et al. (2016), who showed that bacteria and fungi were able to degrade soluble ^{13}C from plant residues and concluded that distinct bacterial and fungal energy channels were not apparent for labile versus recalcitrant substrates.

Thus, decomposition of residues in the adjacent soil certainly results from both soluble residue C diffusion and assimilation by soil microorganisms (Gaillard et al., 1999) and residue C translocation by fungi, especially in the case where fungi need N for residue decomposition (Frey et al., 2003). Degrading microorganisms were mainly concentrated near residues. In our experiment, the degrading microbial biomass (within 2 mm distance from the residues) represented 19% of the total microbial biomass at pF 1.5 and 13% at pF 3.5, which is consistent with Poll et al. (2006), who estimated the total microbial biomass to be 5 to 20% of the total PLFAs at 1 mm from the residues. Gaillard et al. (1999) showed that the microbial biomass involved in the degradation of wheat straw represented 12.5-20.4% of the total microbial biomass.

3.5.3. Impact of matric potential on the detritusphere

In our experiment, we considered a detritusphere functioning under different soil moistures, from pF 1.5, where pores with diameters up to 100 µm were filled with water, to pF 3.5, where only pores of less than 1 µm were water saturated. At pF 1.5, 80% of the total soil pore volume was filled with water, while at pF 3.5, only 23% of the total soil pore volume was filled with water[*]. The detritusphere has not yet been studied under such dry conditions, and we expected to find more fungi at pF 3.5 than at other pF values, leading to an increase in the detritusphere size because of residue C translocation through fungal hyphae becoming the main transfer process.

From the start of the incubation, the mineralization of residue C was significantly larger at pF 1.5, when the soil was wet, than at pF 3.5 (Fig. 20). These results are consistent with the many experiments monitoring the mineralization of residues at different soil moistures when incorporated and mixed with soil (Moyano et al., 2012). The mineralization of residue C may occur on the residues themselves and in soil after the transfer of C from residues into soil, either by diffusion or by fungal translocation. Gaillard et al. (2003) showed that the residues themselves were the main sites of mineralization. Depending on litter quality, they found that in the short term, 24 to 33% of the residue C mineralization occurred in the soil, and 76 to 67% occurred on the residues themselves. Even if we did not directly measure

[*] Calculation details: $\theta_{pF1.5}$ x 100 / $\theta_{saturation}$ = 0.49*100/0.61 = 80%
$\theta_{pF3.5}$ x 100 / $\theta_{saturation}$ = 0.14*100/0.61 = 80%

the contribution of the two spatial compartments (residues and detritusphere soil) to the total mineralization, our results are consistent with those of Gaillard et al. (2003) since we observed a strong correlation between the decrease in ^{13}C in the residue layer and ^{13}C mineralization. Furthermore, the quantity of degrading microorganisms detected in soil after 7 days (0.00003% of soil ^{13}C) was very low, suggesting that the microbial uptake of residue C and its mineralization in soil were small.

Nevertheless, we showed that a fraction of residue C was transferred into soil. C transport occurred early in the incubation, as previously observed by Gaillard et al. (1999) and Poll et al. (2006, 2008). The transfer of ^{13}C into soil was dependent on the matric potential. Indeed, after 7 days, the transfer of ^{13}C from residues into soil was significantly higher at pF 1.5 than at pF 3.5 (13 and 9% of added ^{13}C, respectively) and was observed over longer distances (14 mm at pF 1.5 and between 6 and 12 mm at pF 3.5) (Fig. 22 and 26). Poll et al. (2006) observed that the amount of maize-derived C in the detritusphere was 55% higher in soil at pF 1.8 than at pF 2.5 and mainly concentrated within the first 1.2 mm from the residue layer. However, in our experiment, the transfer of ^{13}C from the residues into soil under dry conditions reached the same distance as that under high-moisture conditions after 15 days. Thus, the detritusphere in the dry soil was of the same dimension as in the wet soil but appeared with a time lag. This result shows that the temporal pattern of C transport was impacted by the soil moisture.

Unexpectedly, the amounts of degrading microorganisms (^{13}C labelled) were low and similar at pF 1.5 and pF 3.5 after 7 days. These results are contradictory to those of Poll et al. (2006), who observed that more maize C was incorporated into PLFAs at pF 2.5 than at pF 1.8. In dry soil, there were fewer degrading fungi than in wet soil, while the analysis of total microbial PLFAs showed that the dry soil was, as expected, dominated by fungi and gram+ bacteria, which are more resistant to water stress than gram- bacteria. Furthermore, more bacteria had assimilated residue C between 2 and 4 mm at pF 1.5 than at 3.5, probably due to a stronger and more distant diffusion of residue C, while fungi were only concentrated in the 0-2 mm zone. Hence, translocation of residue C by fungal hyphae seems negligible over distances larger than 2 mm. Thus, we assumed that under both low- and high-moisture conditions, the transport of residue C into the soil was mainly due to diffusion. Fungi assimilated residue C directly in the vicinity of the residues, while bacteria were more dependent on residue C transport in the adjacent soil. Therefore, the results of this study did not confirm our initial hypothesis on the role of fungi in dry soils.

In addition, the analysis of the microbial communities showed that the

microorganisms involved in the degradation of residues (^{13}C-microbial PLFAs) were different from total microorganisms but similar at pF 1.5 and pF 3.5. Therefore, we assumed that carbon use efficiencies of degrading microorganisms located in the detritusphere soil were similar under the two studied moisture conditions and that residue C mineralization fluxes from soil after 7 days were small and equivalent regardless of matric potential.

The proportion of active microorganisms (^{13}C-PLFAs/total PLFAs) was nevertheless higher at pF 1.5 than at pF 3.5 (7% vs 4%), suggesting that an increased water content promoted accessibility and contact probabilities between microorganisms and the substrate as expected.

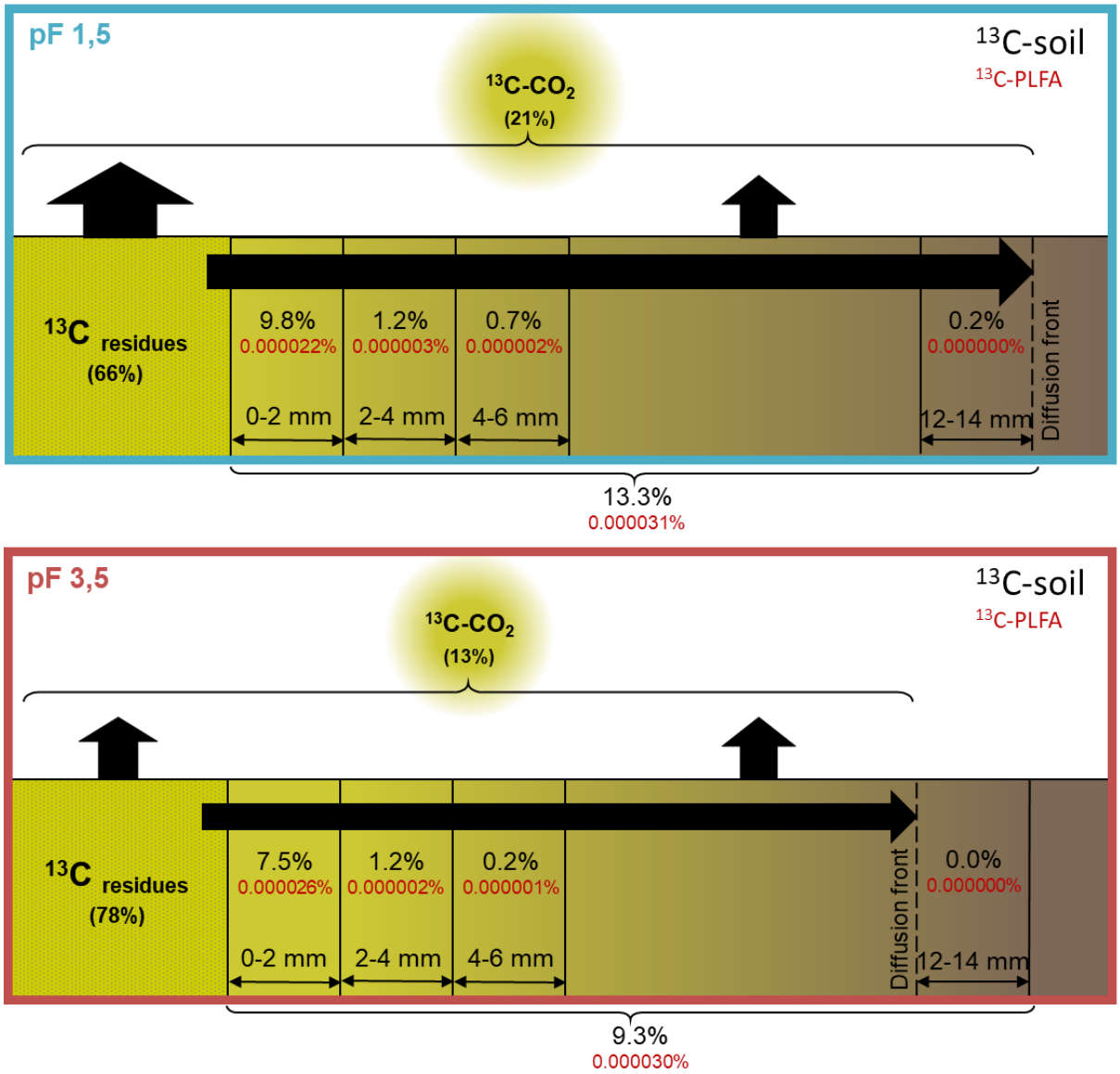


Figure 26 - Distribution of residues-C in different spatial compartments after incubation of maize inflorescence for 7 days at pF1.5 (on top) and 3.5 (on bottom), expressed in percentages of initial ^{13}C

3.6. Conclusion

We found that the detritusphere constituted an area a few millimetres thick around decomposing residues, and most of the carbon transferred from the residues to the soil was found in the first 2 millimetres regardless of the soil moisture. Soil moisture still played a role in influencing the rates of transfer of residue C beyond this zone, but this effect remained minor, as only small amounts of residue C were transported beyond 2 mm. The drier the soil, the more abundant the fungi, but fungi were not the main organisms causing residue C mineralization in the detritusphere soil. Most of the residue C mineralization took place on the residues themselves, at least in the first stages of decomposition, confirming that detritusphere hotspots represent a very small proportion of the soil volume, i.e., fresh residues and a few adjacent millimetres, where most of the microbial activity and biogeochemical processes took place.

3.7. Supplementary materials

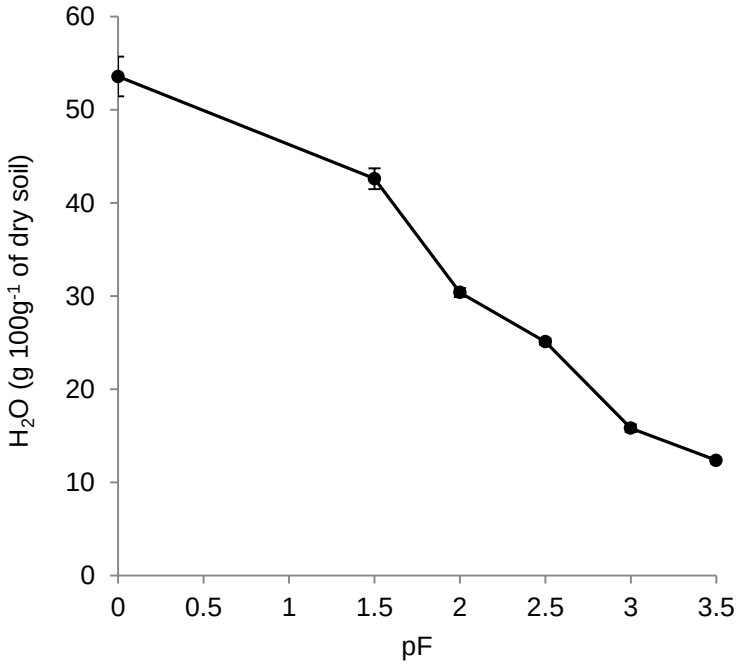
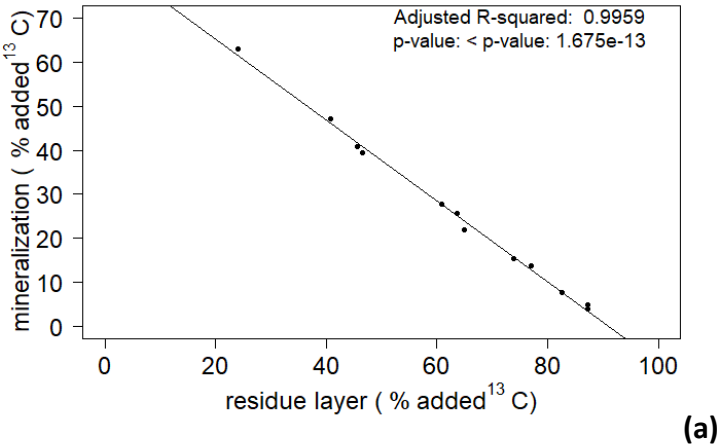
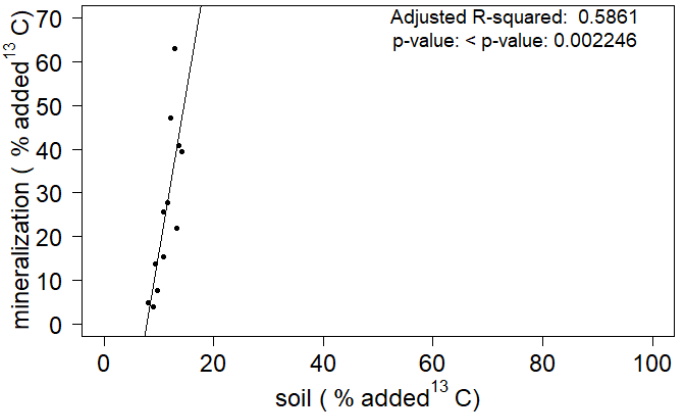


Figure 27 - Water retention curve of the studied soil (n=3). (pF = - log h where h is the pressure applied in water cm).



(a)



(b)

Figure 28 - Correlations between 13C in the residue layer and mineralized 13C (a), and between 13C in the soil layer and mineralized 13C (b).

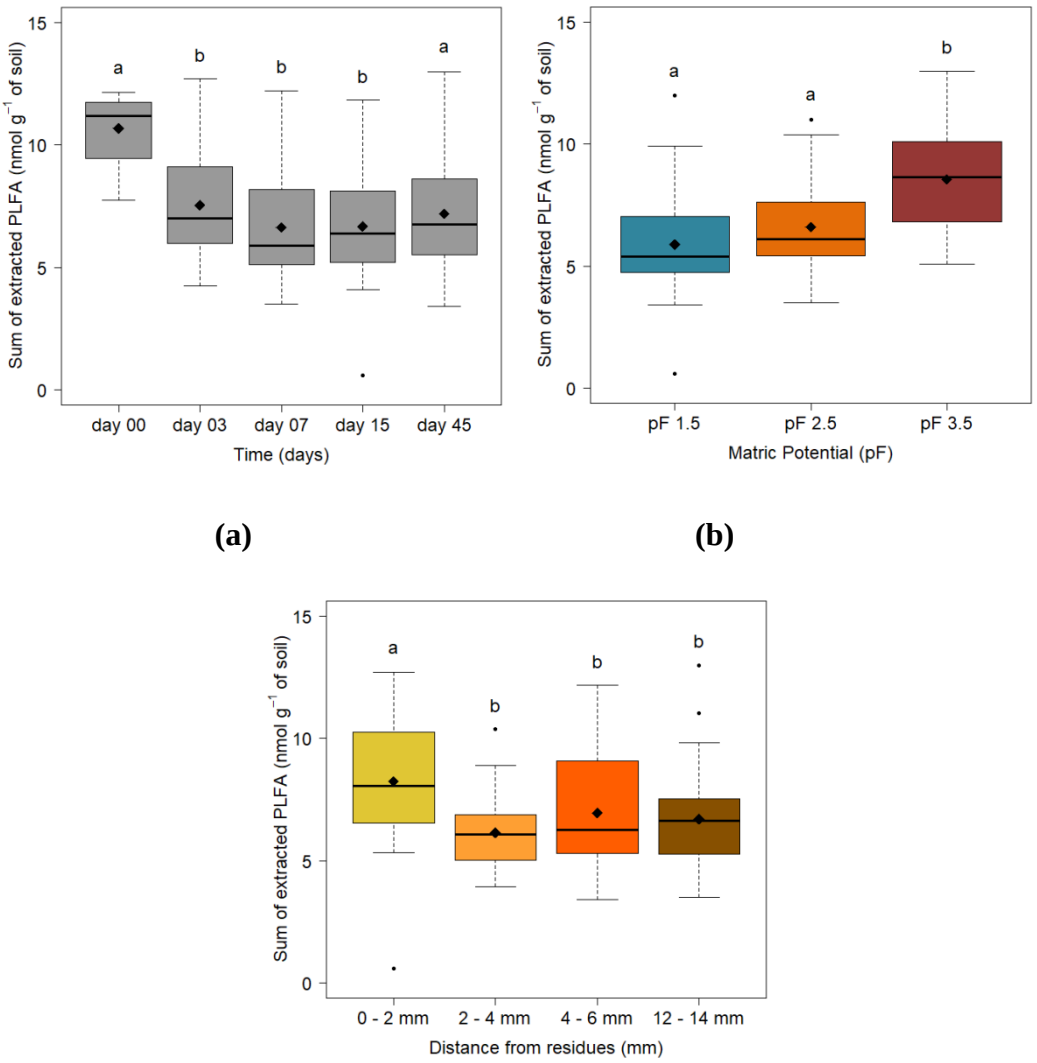
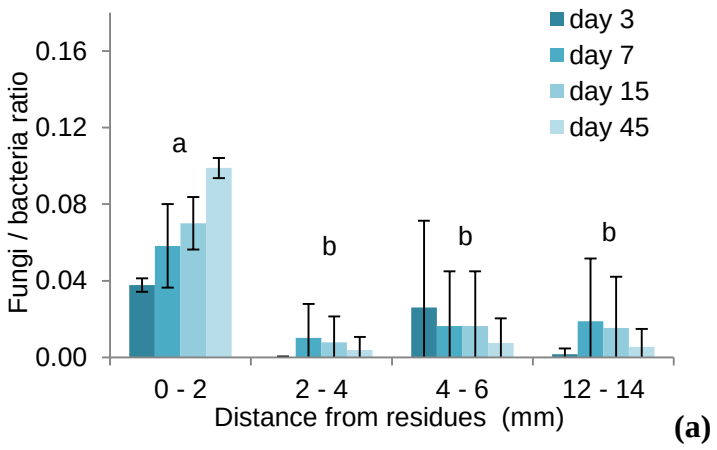
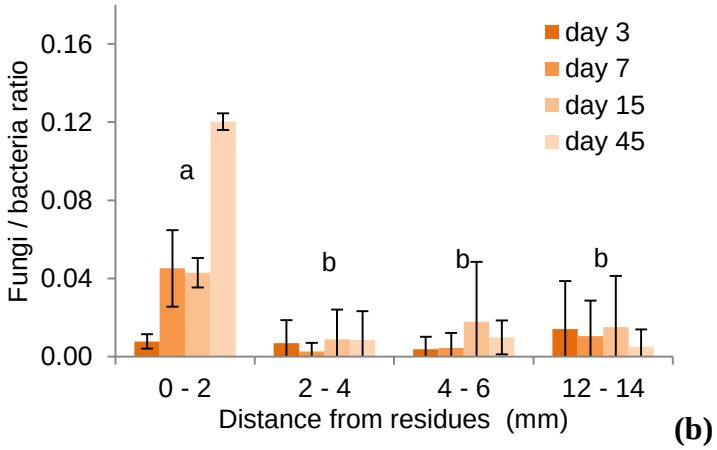


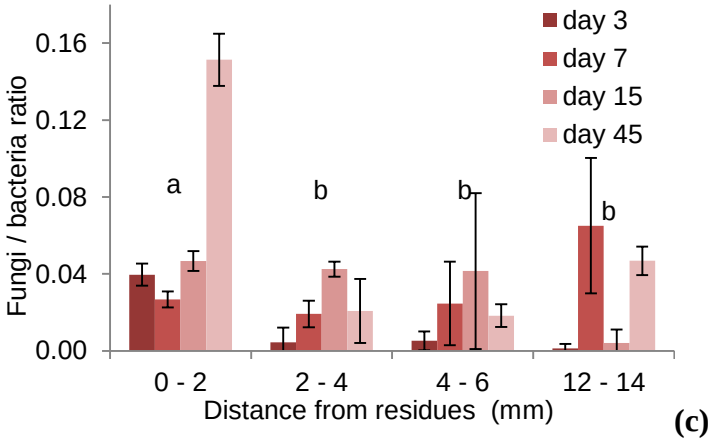
Figure 29 - Total microbial PLFA - all treatments combined - according to the different sampling dates (a), the different pFs (b) and the distances from residues (c). Black diamonds correspond to the means and the letters to the results of the statistical tests (Dunn test).



(a)

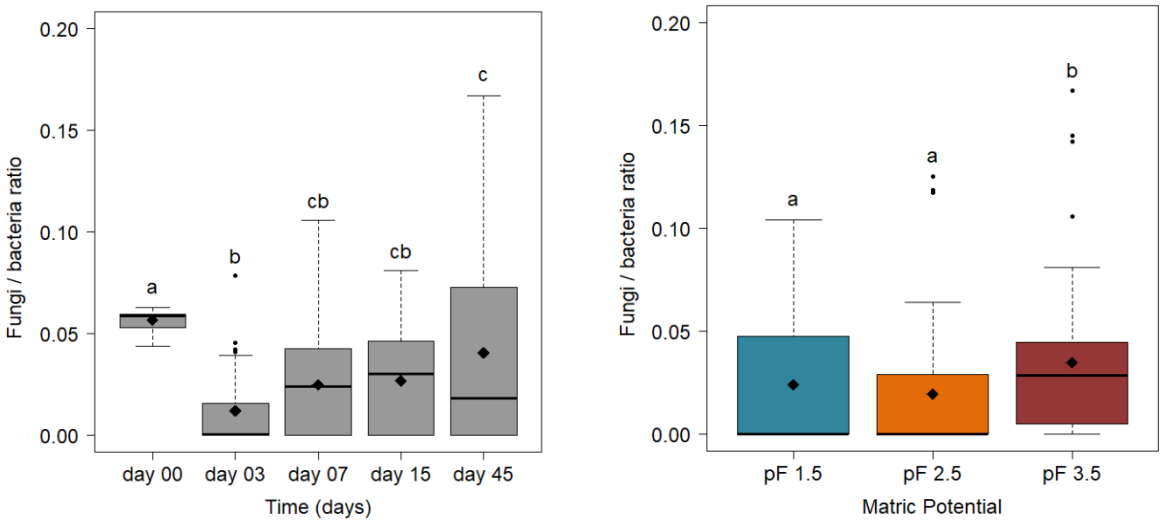


(b)



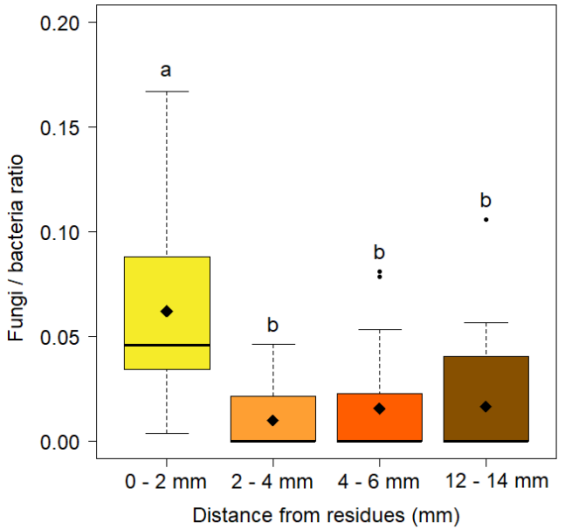
(c)

Figure 30 - Evolution of the fungi/bacteria ratios in different soil slices located at increasing distances from the residue layer (0-2, 2-4, 4-6 and 12-14 mm) after 3, 7, 15 and 45 days of incubation at pF1.5 (a), pF2.5 (b) and pF3.5 (c). The bars correspond to the standard deviation of the replicates and the letters to the results of the statistical tests (Dunn test) between slices 0-2, 2-4, 4-6 and 12-14 mm (all dates combined).



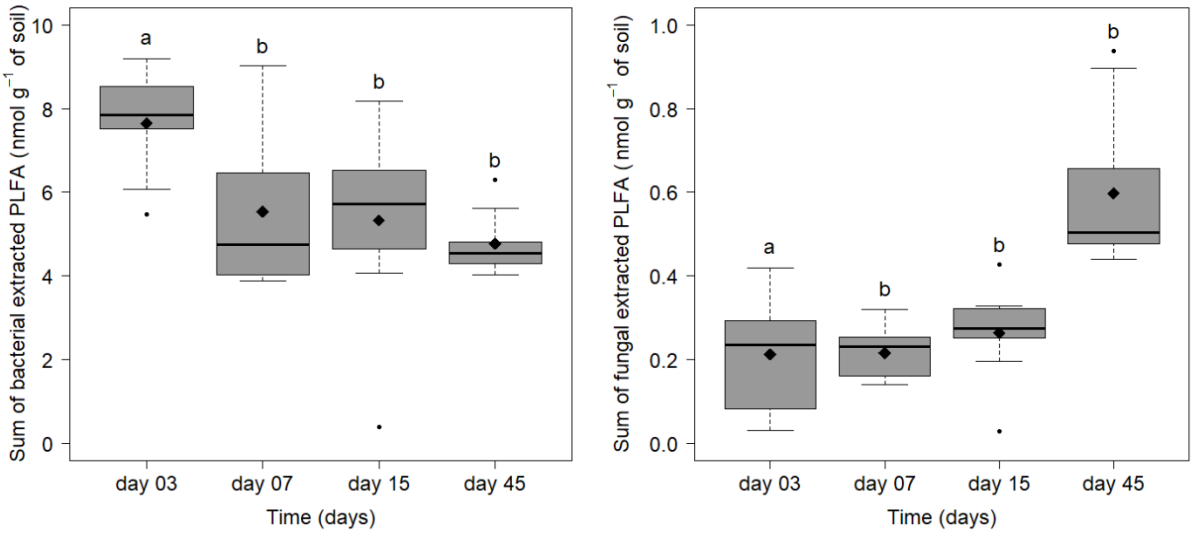
(a)

(b)



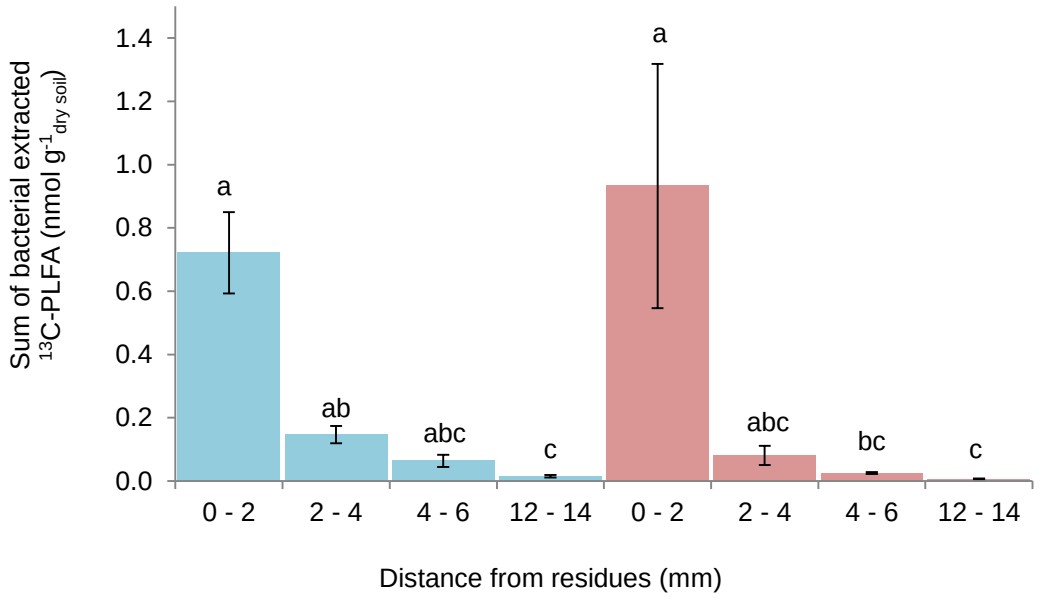
(c)

Figure 31 - Fungi/bacteria ratios, all treatments combined, according to the different sampling dates (a), the different pFs (b) and the distances from residues (c). Black diamonds correspond to the means and the letters to the results of the statistical tests (Dunn test).

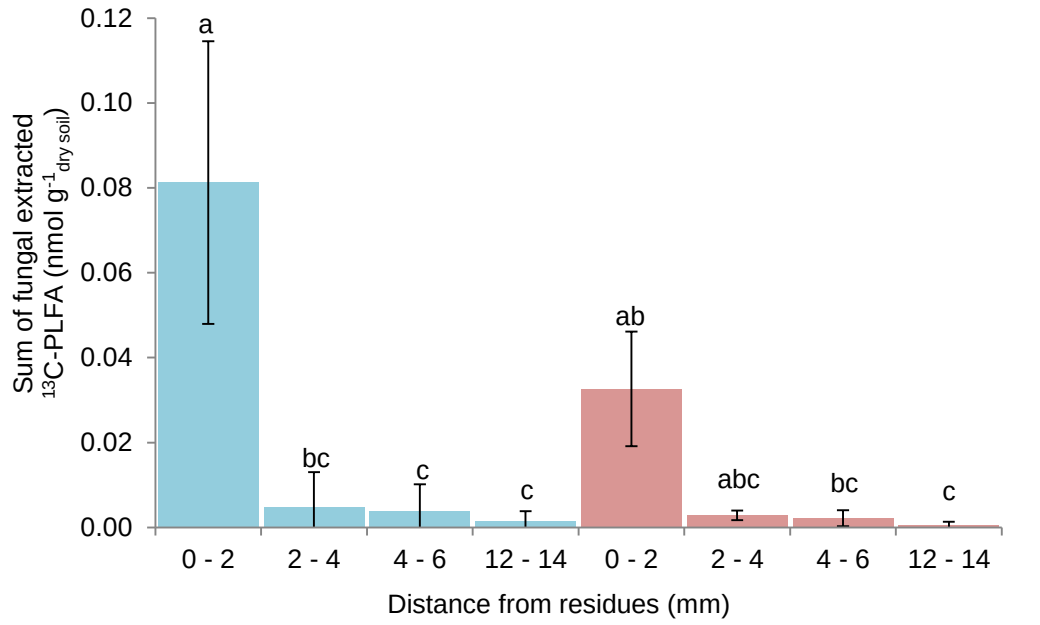


(a) **(b)**

Figure 32 - Bacterial (a) and fungal (b) PLFA contents in the 2 first mm of soil, all matric potentials combined, and according to the different sampling dates. Black diamonds correspond to the means and the letters to the results of the statistical tests (Dunn test).

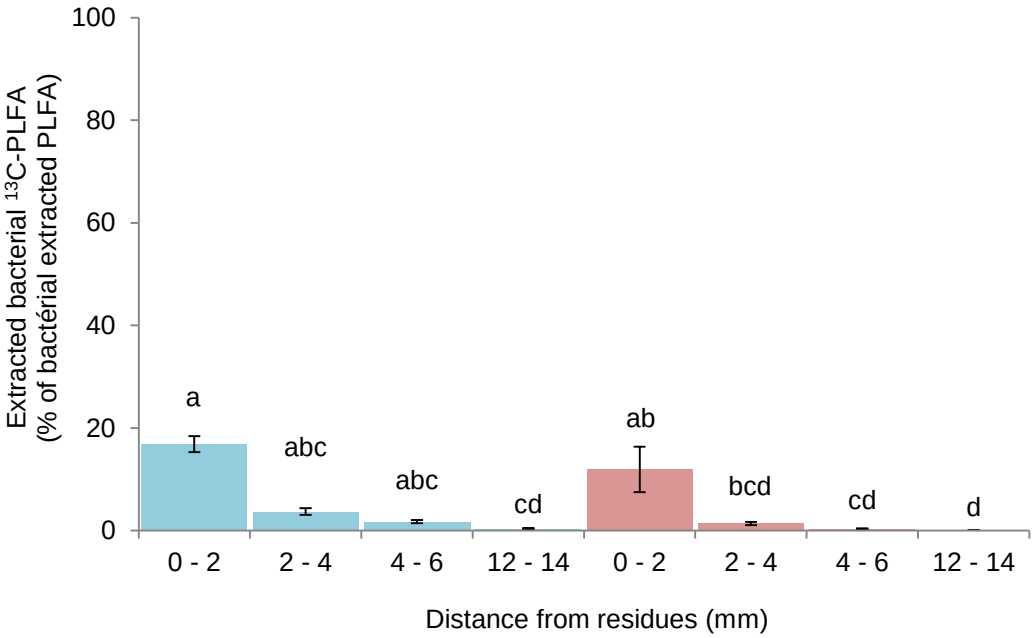


(a)

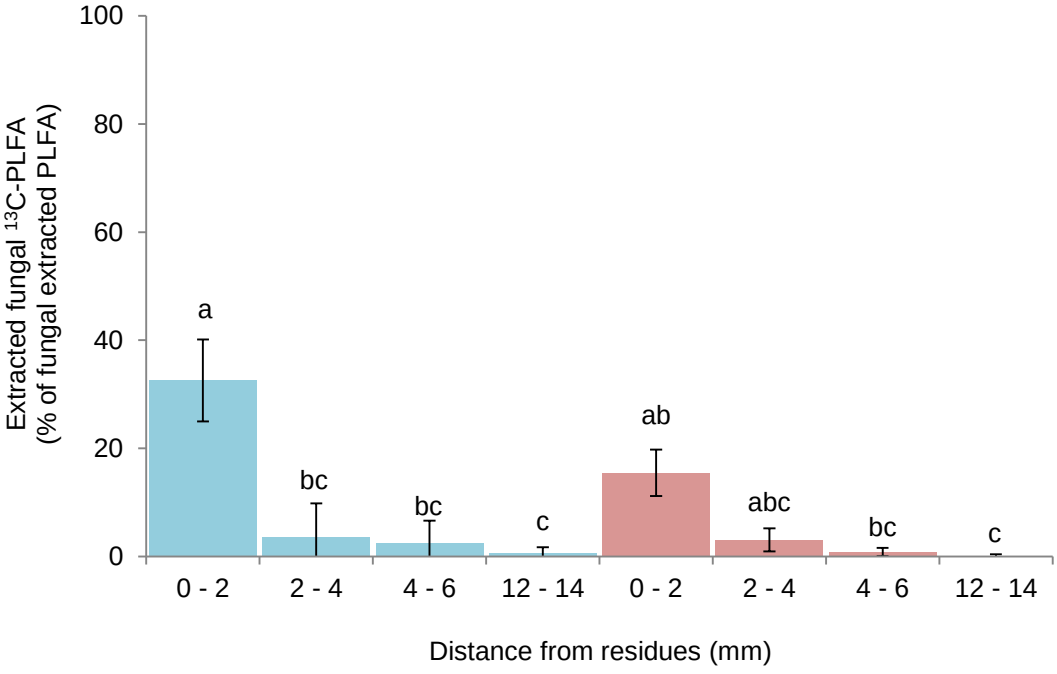


(b)

Figure 33 - Bacterial (a) and fungal (b) 13C-PLFA contents in different soil slices located at increasing distances from the residues (0-2, 2-4, 4-6 and 12-14 mm) at pF 1.5 (blue) and 3.5 (red) after 7 days of incubation. The letters correspond to the results of the statistical tests (Dunn test).



(a)



(b)

Figure 34 - Percentage of bacterial (a) and fungal (b) 13C-PLFA contents expressed in % of total PLFA in different soil slices located at increasing distances from the residues (0-2, 2-4, 4-6 and 12-14 mm) at pF 1.5 (blue) and 3.5 (red) after 7 days of incubation. The letters correspond to the results of the statistical tests (Dunn test).

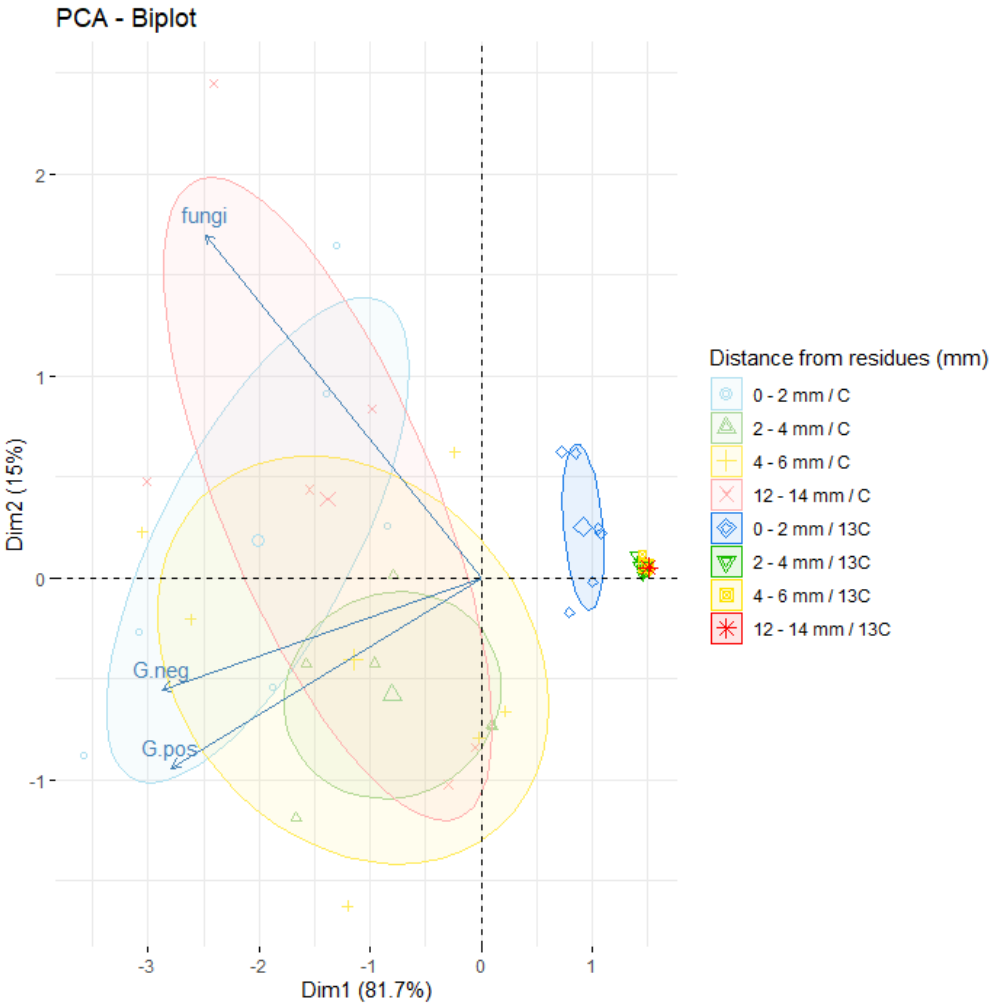


Figure 35 - Principal Component Analysis (PCA) of total PLFA and 13C-PLFA according to distances from the residues layer

Table 2. Size and microbial community evolution of detritusphere according to various incubation set-ups.

Soil	Residues	C:N / soluble C (% residue) / soluble fraction (% residue)	Matric potential (pF)	Temperature (°C)	Incubation time (days)	Soil analyses	Detritusphere size (mm)	Reference
Orthic luvisol	Mature wheat straw	166 / 5 / -	pF2.9	15	100	SOC, ^{13}C-SOC, DOC ^{13}C-DOC, microbial biomass, ^{13}C-microbial biomass and deshydrogenase activity	3-4	Gaillard et al. (1999)
Sandy loam	Maize straw	- / - / -	-	9	27	DOC and enzymes	1-2	Kandeler (1999)
Eutric cambisol	Mature wheat straw	167 / 5 / 17	pF2.2	15	10	CO_2 and $^{13}CO_2$	4-5	Gaillard et al. (2003)
	Young rye leaves	09 / 10 / 52			3		5-6	
Typic Fluvaquent	Rice straw	26 / 9 / -	pF2.0	25	30	SON, inorganic N and microbial biomass N	<2 / >10	Moritsuka et al. (2004)
	Rice bran	19 / 15 / -					<2 / >10	
	Beech leaves	46 / 7 / -					<2 / >10	
Woodburn silty loam	Unleached ryegrass straw	- / - / -	-	25	80	PLFA	-	McMahon et al. (2005)
	Leached ryegrass straw							
	Ryegrass leachate							
Stagnic luvisol	Maize leafs and stems	- / - / -	pF1.8	10	14	SOC, ^{13}C-SOC, PLFA, ^{13}C-PLFA, and enzymes	1.5–2.8	Poll et al. (2006)
			pF2.5				1.5–2.8	
			pF1.8 advection				2.5–3.0	
			pF2.5 advection				2.5–3.0	
Orthic luvisol	Mature wheat straw	66 / 5 / 23	pF2.7	15	168	SOC, ^{13}C-SOC, inorganic N, microbial biomass, ^{13}C-microbial biomass,	-	Nicolardot et al. (2007)
	Young rye leaves	21 / 17 / 53						
Stagnic luvisol	Rye	40 / - / -	pF1.8	10	84	SOC, ^{13}C-SOC, DOC ^{13}C-DOC, microbial biomass, ^{13}C-microbial biomass, ergosterol and enzymes	>3	Poll et al. (2008)
			pF2.5				>3	
Orthic luvisol	Mature wheat	- / - / -	pF2.7	15	168	16S and 18S rDNA	-	Bastian et al. (2009)
Orthic luvisol	Wheat	- / - / -	Field condition	Field condition	244	inorganic N, microbial biomass and 16S rRNA,	-	Pascault et al. (2010)
Quartz sand	wheat residue	- / 1.6 / -	-	22-25	30	PLFA	-	Marschner et al. (2011)
Chernozem	Mature wheat	74 / 2.3 / -	-	20	23	Inorganic N, PLFA, ^{13}C-PLFA, fungal PLFA, bacterial PLFA and enzymes	4 / >5	Marschner et al. (2012)
Cambisol/Luvisol /Stagnic luvisol	Maize leaves	- / - / -	-	12	32	CO2, ^{13}CO2, PLFA, ^{13}C-PLFA, rRNA and ^{13}C-rRNA	-	Kramer et al. (2016)
	Maize roots							
Luvisol/Cambisol	Senescent maize leaves	- / - / -	pF1.8	20	60	SOC, extractable organic C, microbial C and PLFA	-	Müller et al. (2017)
Luvisol	Maize inflorescence	20 / - / 23	pF1.5	20	50	SOC, ^{13}C-SOC, PLFA and ^{13}C-PLFA	2	Védère et al. this study
			pF2.5				2	
			pF3.5				2	

Chapitre 4: Priming effect induit par la biodégradation d'un résidu végétal à différents potentiels matriciels

Chapter 4: Priming effect induced by plant residue biodegradation at different matric potentials

4. Priming effect induit par la biodégradation d'un résidu végétal à différents potentiels matriciels

4.1. Introduction

Le Priming effect a été mis en évidence pour la première fois en 1926 par Löhnis qui, étudiant la décomposition d'un compost de déchets verts dans le sol, a détecté une intensification de la minéralisation de l'azote du sol lors de cette addition de matière organique fraiche (Kuzyakov et al., 2000). Par la suite, d'autres études ont également permis de constater cet effet qui a alors pu être démontré grâce à l'apparition des techniques isotopiques (Broadbent et Norman, 1947; Broadbent, 1948).

Le terme de « priming effect » a été proposé par Bingeman et al. (1953) et le processus défini comme une minéralisation plus importante de matière organique du sol, dans un sol recevant un amendement organique, qu'elle ne l'eut été dans un sol non amendé, ou par Dalenberg et Jager (1989) comme le résultat d'une minéralisation supplémentaire du carbone organique du sol après un apport de matière organique facilement dégradable au sol.

Une définition plus récente et plus complète proposée par Kuzyakov et al. (2000) est la suivante : les effets d'activation ou priming effect sont de forts changements à court terme dans le turnover de la matière organique du sol causés par des traitements modérés du sol tels que les apports de fertilisants organiques ou minéraux au sol, l'exsudation de substances organiques par les racines dans le sol, les traitements mécaniques du sol ou même les phénomènes de séchage et ré-humidification du sol. Ce phénomène pourrait être à l'origine de pertes d'azote et de carbone du sol significatives à échelle globale et les facteurs qui l'influencent doivent être étudiés et compris afin de mieux décrire les cycles de ces éléments (Luo et al., 2016).

Il existe différents types de priming effect. Le priming effect positif est une sur-minéralisation du carbone et/ou azote et le priming négatif est une sous-minéralisation. Le priming effect négatif apparait généralement dans les phases précoces après apport de matière organique fraiche sur quelques jours seulement alors que le priming effect positif peut durer sur plusieurs semaines. Kuzyakov et al. (2000) distinguent de plus un priming effect apparent et réel. En effet un effet d'activation réel affecte le turnover de la matière organique du sol tandis que le priming effect apparent présente un turnover constant et correspond à des

échanges rapides entre compartiments de l'azote du sol. Le priming effect apparent peut correspondre à une augmentation du turnover du carbone microbien (Fontaine et al., 2011) et est parfois associé aux effets des erreurs d'expérimentation (non-uniformité du marquage des substrats, mauvais piégeage du CO_2 minéralisé, etc.) pouvant induire un effet similaire, ces derniers étant parfois plutôt qualifiés de priming effect artificiel (Blagodatskaya et Kuzyakov, 2008).

Le priming effect est un phénomène d'intensité très variable. Une méta-analyse de Luo et al. (2016) a estimé que l'amplitude moyenne du priming effect était de + 67% de la minéralisation basale du sol sur les 2 premiers jours après les apports (avec 95% des données comprises entre +46% et +93% de sur-minéralisation) et de +37% pour l'ensemble des dates observées (jusqu'à presque 200 jours) . Cela montre bien que si des dynamiques similaires peuvent être observées, l'amplitude du priming effect est très variable selon de multiples facteurs et mécanismes impliqués qui restent mal identifiés.

En effet, les mécanismes étant à l'origine du priming effect positif sont encore discutés et les principales hypothèses sont les suivantes : la sur-minéralisation observée pourrait être due i) à une augmentation de l'activité des microorganismes stimulée par les apports de matières organiques facilement biodégradables et donc une production d'enzymes extracellulaires biodégradant les matières organiques natives du sol, ii) à des interactions entre microorganismes, faune du sol, plantes voire mineraux ou encore iii) à un processus de compétition microbienne :

(i) Le priming effect est un processus biologique puisqu'on n'observe pas de priming effect réel en conditions stériles (Kuzyakov et al., 2000). Les apports de matière organique facilement dégradable ont pour effet de stimuler la biomasse microbienne et ses activités enzymatiques extracellulaires (Nannipieri et al., 1983; Asmar et al., 1994). Asmar et al. (1994) ont montré que l'ajout de glucose dans un sol entrainait une plus forte activité enzymatique permettant donc la libération de nutriments facilement utilisables par les organismes du sol pouvant mener à un priming effect.

Les nutriments à l'origine du priming effect proviennent dans ce cas-là de la minéralisation des matières organiques du sol non vivantes. Il est également possible que la mort des microorganismes du sol, consécutive à des épisodes de sécheresse et de ré-humectation par exemple, libère des composés organiques et soit à l'origine d'un priming effect (Van Gestel et al., 1993; Pulleman et Tietema, 1999).

(ii) L'exsudation par les plantes de ressources nutritives peut également stimuler la biomasse microbienne et par conséquent la minéralisation de l'azote du sol. Par ailleurs, il a été montré que des exsudats racinaires comme l'acide oxalique, peuvent entrainer un priming effect par la dissolution ou la complexation avec les phases minérales protectrices des matières organiques entrainant leur libération dans le sol (Keiluweit et al., 2015).

L'augmentation de microorganismes favorise également la prédation par les protozoaires microbivores, libérant également de l'azote sous forme NH_4^+. L'azote minéral provenant de l'activité microbienne et de la prédation est alors utilisable par les plantes (Kuzyakov et al., 2000).

(iii) Les interactions microbiennes sont, par ailleurs, au cœur des phénomènes de priming effect. Ainsi selon Fontaine et al. (2003), la sur-minéralisation observée serait fonction du type de microorganismes actifs (stratèges r ou K). Il est avancé que le priming effect est plus important lorsque les ressources sont rares, limitant le développement des stratèges r et entrainant une meilleure compétitivité des stratèges K. Par ailleurs, une succession de microorganismes tout au long de la décomposition des matières organiques peut également expliquer le priming effect. Cette succession a généralement lieu entre les microorganismes stratèges-r capables de dégrader et d'assimiler la matière organique simple et dont la croissance est très rapide leur permettant de dominer les phases précoces de la dégradation, et les microorganismes stratèges-K capables de dégrader la matière organique plus complexe et dont la croissance est plus lente et dominant principalement dans les phases ultérieures. Les enzymes produites et libérées dans le sol par les stratèges-r pour dégrader la matière organique fraiche sont probablement également en partie capables de dégrader les matières organiques du sol et les parties non dégradées car trop complexes permettent alors un développement des stratèges-K dont les enzymes, efficaces pour dégrader les matières organiques plus récalcitrantes, le sont aussi pour dégrader celles du sol.

Le priming effect peut être mis en lien avec l'existence de hot-spots. En effet, la rhizosphère comme la détritusphère sont des lieux d'apports en matières organiques facilement assimilables et il en est de même dans la drilosphère où la matière organique native ou transformée (déjections) peut être véhiculée dans les galeries des vers de terre (Kuzyakov et al., 2000; Kuzyakov, 2010).

Le priming effect dans ces hot-spots peut s'exercer sur des durées très variables. Beaucoup

d'études se focalisent principalement dans les premières phases du priming effect lorsque celui-ci est le plus fort mais ces phases sont bien souvent liées au priming effect apparent. De plus, on sait aussi que le priming effect réel peut être relativement tardif et apparaitre jusqu'à quelques semaines après les apports de matières organiques (Kuzyakov, 2010).

Le priming effect varie également au sein de ces différents hot-spots en fonction de la nature de la matière organique. Dans la rhizosphère par exemple, les exsudats des plantes ne sont pas de même qualité que les résidus de culture complexes apportés au sein de la détritusphère. Il est admis que la qualité et la quantité des apports organiques, influent fortement sur le priming effect. Les apports de matières organiques simples entrainent généralement un priming effect plus intense et rapide, dû à une assimilation rapide des substrats par les microorganismes du sol en grande majorité capables de les dégrader (Luo et al., 2016). Les microorganismes impliqués sont ceux ayant des capacités de croissance importantes. Dans certains cas, les matières organiques simples n'entrainent pas de priming effect (Fontaine et al., 2003), en particulier lorsqu'elles sont apportées en faible quantité. Plus que les quantités de carbone apportées, il semble que le facteur déterminant soit le rapport entre le carbone apporté et le carbone présent dans la biomasse microbienne. Au sein d'une méta-analyse, Blagodatskaya et Kuzyakov (2008) affirment qu'un apport de carbone frais égal à 0-15% du carbone microbien entraine un priming effect positif et proportionnel à la quantité de carbone apportée. Si ce ratio est de 50 à 200%, on observe un priming effect mais qui diminue de manière exponentielle avec la quantité de carbone apportée. Au-delà de 200%, on observe un priming effect négatif. Les matières organiques complexes entrainent également un priming effect, mais il est généralement moins intense et observé sur une plus longue durée. La succession et la compétition entre microorganismes (stratèges-r puis stratèges-K) sont souvent avancées pour en expliquer la dynamique (Fontaine et al., 2003; Blagodatskaya et Kuzyakov, 2008; Kuzyakov, 2010). Les matières organiques complexes, contrairement aux substrats simples qui sont très rapidement utilisés, entrainent davantage de modification de la structure des communautés de microorganismes car elles sont plus difficiles à dégrader et leur dégradation implique une plus grande diversité de microorganismes.

Par ailleurs, lorsque le substrat apporté est riche en azote, les microorganismes utilisent directement l'azote du substrat apporté alors que si le substrat est pauvre en azote avec un rapport C/N élevé, les microorganismes ont besoin de combler le manque d'azote en allant chercher de l'azote dans le sol et en dégradant les matières organiques du sol, ce qui entraine alors un priming effect (Luo et al., 2016). Ainsi, des apports riches en azote (comme du trèfle) sont à l'origine d'un priming effect important, mais bref, tandis des apports plus pauvres en

azote (comme du blé ou du lin) génèrent un priming effect moins fort mais sur une durée plus longue (Pascault et al., 2013; Fanin et al., 2020). Des cas d'utilisation préférentielle des substrats disponibles dans le milieu ont par ailleurs été observés avec des apports de sucre, de compost verts et matières organiques du sol apportés dont la dégradation a été suivie. L'utilisation préférentielle des substrats disponibles des plus simples vers les plus complexes impacte le priming effect, des substrats simples entrainant un priming effect négatif et des substrats complexes entrainant un priming effect positif, résultant de l'activité de différentes communautés microbiennes (Kuzyakov et Bol, 2006).

Les caractéristiques du milieu modulent également le priming effect. La méta-analyse de Luo et al. (2016) montre que l'intensité du priming effect est négativement corrélée à l'humidité du sol du fait d'une décomposition plus rapide des matières organiques en conditions humides qu'en conditions sèches. La décomposition rapide peut aussi induire une diminution de l'oxygène disponible en conditions humides selon les quantités de substrat apportées. Ces résultats ont cependant été obtenus dans une gamme de conditions hydriques négligeant les conditions sèches (<17% de la capacité de rétention du sol) (Luo et al., 2016) et des études complémentaires seraient donc nécessaires pour compléter ces résultats.
La qualité des sols est également décisive. Un priming effect plus important a souvent été observé dans un sol pauvre en carbone et azote où l'activité de dégradation est en général faible (Blagodatskaya et Kuzyakov, 2008; Luo et al., 2016). L'apport de matières organiques décomposables joue alors le rôle de déclencheur entrainant une biodégradation du carbone du sol initialement peu dégradé.
Enfin, parmi les autres facteurs, Blagodatskaya et Kuzyakov (2008) ont noté que le priming effect était généralement plus important dans les sols dont le pH est compris entre 6 et 8 que ce soit en cas d'apports de substrats simples ou complexes, car les activités et modifications des structures de communautés de microorganismes ainsi que la synthèse d'enzymes nécessaires à la dégradation des matières organiques sont favorisées à ces pH.

Le priming effect est généralement très important dans les premiers jours après apport de matières organiques. Durant les 2 premiers jours d'incubation, on observe un priming effect positif (73% des cas), mais on peut aussi observer un priming effect négatif (12% des cas) (Luo et al., 2016). Les modifications de structure des communautés microbiennes ont une importance capitale dans le priming effect ; or ces modifications peuvent être relativement lentes avec des matières organiques plus complexes et le priming effect peut dans ce cas-là,

rester significatif jusqu'à plusieurs centaines de jours après les apports (Kuzyakov, 2010; Fontaine et al., 2011; Pascault et al., 2013; Luo et al., 2016; Fanin et al., 2020).

L'analyse de la littérature consacrée au priming effect, très abondante, montre cependant relativement peu d'études sur des périodes de temps longues, ni faisant varier les conditions du milieu, en particulier l'état hydrique du sol.
Ainsi, en continuité avec l'expérience mise en place dans le chapitre 3, nous avons prolongé l'incubation de 50 jours à 601 jours, pour suivre l'évolution de la minéralisation des résidus de culture apportés et quantifier un priming effect éventuel sur une période longue.
Les objectifs de cette étude étaient i) d'analyser la dynamique d'un priming effect induit par des apports localisés de résidus complexes dans un sol à long terme, mais également ii) d'étudier l'effet de l'humidité du sol sur le priming effect observé et enfin iii) de mettre en lien priming effect, structure des communautés microbiennes et dégradation des résidus grâce au données présentées dans le chapitre précédent.

Le priming effect résulte d'une stimulation des microorganismes du sol suite à l'apport de composés organiques facilement décomposables, et donc de la production d'enzymes extracellulaires qui biodégradent la matière organique native du sol. Nous faisons l'hypothèse qu'une augmentation de la teneur en eau du sol pourrait (i) favoriser la diffusion de composés solubles des résidus de culture apportés dans le sol et donc davantage stimuler l'activité des microorganismes du sol et donc le priming effect, (ii) augmenter la continuité du réseau poral rempli d'eau et donc favoriser l'accès de ces microorganismes ou de leurs enzymes extracellulaires aux matières organiques du sol, et augmenter le priming effect, (iii) changer la composition des communautés microbiennes et en particulier celle des stratèges K, dont le rôle dans le priming effect a été mis en avant (Fontaine et al., 2003).

4.2. Matériels et Méthodes

4.2.1. Préparation des cosmes

Un jeu de 21 cosmes (4 cosmes avec résidus et 3 cosmes « contrôles » sans résidus pour chacune des trois humidités) a été préparé de la même façon que décrit dans le chapitre 3 pour le suivi de la minéralisation totale et ^{13}C.

4.2.2. Mesures de minéralisation à l'échelle d'un cosme de sol

La minéralisation du carbone organique a été régulièrement suivie à l'échelle des cosmes pendant 601 jours, avec des mesures aux jours : 1, 3, 7, 15, 21, 28, 35, 42, 50, 70, 85, 108, 147, 202, 246, 301, 358, 421, 497, 534 et 601. Le CO_2 total a été mesuré à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (Agilent, 490 Micro GC System, CA, USA) et sa concentration, obtenue en ppm, a été convertie en µg $C\text{-}CO_2.g^{-1}$ de sol sec par la relation (1) suivante :

(1) $C\text{-}CO_{2\ (total)} = (CO2\ (_{total\text{-}ppm}) / m_{\ sol\ sec}) \times \rho C$,

où $CO_{2\ (total\text{-}ppm)}$ est la teneur en CO_2 total en ppm, $m_{\ sol\ sec}$ est la masse de sol sec du cosme en g et ρC est la masse volumique du carbone en $\mu g.\mu L^{-1}$. Le tout dans un volume d'air d'1L (le volume des cosmes a été négligé dans le calcul).
Le $^{13}C\text{-}CO_2$ a été mesuré par un chromatographe en phase gazeuse (5890 GC Hewlett-Packard, CA, USA) couplé avec un spectromètre de masse isotopique (Isochrome III, Optima, Micromass- GVI Ltd, Manchester, UK). Le $\delta^{13}C$ mesuré dans l'atmosphère des bocaux ($\delta_{mesuré}$), celui des résidus ($\delta_{résidus}$), et celui des MOS (δ_{MOS}) sont exprimés en ‰ relatif au VPDB (Vienna Peedee belemnite) permettant de déduire le %résidusC dans chaque échantillon gazeux mesuré par la relation suivante :

(2) $\%_{résidus}C = (\delta_{mesuré} - \delta_{MOS}) / (\delta_{résidus} - \delta_{MOS})$.

La quantité de $C\text{-}CO_{2(résidus)}$ en µg $C\text{-}CO_2.g^{-1}$ de sol sec est ensuite obtenue par la relation :

(3) $C\text{-}CO_{2(résidus)} = C\text{-}CO_{2\ (total)} \times \%_{résidus}C$,

et la quantité de $C\text{-}CO_{2(sol)}$ pour les cosmes avec résidus et les cosmes contrôles sans résidus, en est déduite par la relation :

(4) $C\text{-}CO_{2(sol)} = (1 - \%_{résidus}C) \times C\text{-}CO_{2(total)}$.

Le priming effect cumulé et relatif sont calculés selon les relations suivantes :

(5) $PE_{cumulé} = C\text{-}CO_{2(sol, avec résidus)} - C\text{-}CO_{2(sol, contrôle)}$.
(6) $PE_{relatif} = PE_{cumulé} / C\text{-}CO_{2(sol)} \times 100$.

L'ensemble des mesures a été réalisé sur 3 réplicats pour les cosmes témoins et sur 4 réplicats pour les cosmes amendés excepté à pF2,5 pour les jours 246, 301, 358 et 421 où l'un des 4 réplicats présentait des valeurs $\delta^{13}C$ anormales ramenant la mesure à 3 réplicats pour les minéralisation $C\text{-}CO_{2(résidus)}$, $C\text{-}CO_{2\ (sol)}$, $PE_{cumulé}$, et $PE_{relatif}$ pour ces dates.

4.2.3. Analyses statistiques

La normalité des jeux de données et l'homogénéité des variances ont été vérifiées *via* le test de Shapiro Wilk (P>0.05) et le test de Bartlett (P>0.05) respectivement. Lorsque ces deux conditions étaient respectées, une analyse de la variance (ANOVA) a été réalisée ainsi qu'un test de comparaisons multiples de Tukey avec un intervalle de confiance de 5%. Lorsque ces conditions n'étaient pas vérifiées, un test non-paramétrique de Kruskal-Wallis ainsi qu'un test de comparaisons multiples de Dunn (avec un intervalle de confiance de 5%) ont été utilisés.

La déviation standard, utilisée pour le priming effect a été calculée telle que décrit dans Kuzyakov et Bol (2004) selon le calcul suivant :
(7) $SD = \sqrt{(SD^2(C - CO2(sol, avec\ résidus) + SD^2(C - CO2(sol, contrôle))}$.

4.3. Résultats

4.3.1. Minéralisation du C issu des résidus (^{13}C)

La minéralisation cumulée des résidus montre, quelle que soit l'humidité, des dynamiques similaires, à savoir une minéralisation très rapide dès le début de l'incubation puis un ralentissement avant d'atteindre un plateau (figure 36). Jusqu'à 70 jours, la minéralisation est d'autant plus forte que le pF est faible avec des différences significatives entre les pF1,5 et 3,5. Après cette date, on observe un ralentissement plus important de la biodégradation dans

les sols les plus humides (pF1,5 et 2,5) que pour le sol le plus sec (pF3,5). Ainsi la minéralisation du C des résidus devient plus importante à pF3,5 qu'à pF2,5 entre 70 et 85 jours. A partir de 108 jours, les différences entre les pF 1,5 et 2,5 deviennent significatives. Après 601 jours, 327,6 µg de $C.g^{-1}$, 277,9 µg de $C.g^{-1}$ et 301,5µg de $C.g^{-1}$ de sol ont été minéralisés aux pF1,5 ; 2,5 et 3,5 respectivement, ce qui représente 63,5%, 53,9% et 58,5% du carbone apporté par les résidus. La moitié de la minéralisation observée après 601 jours a lieu avant 21 jours pour les pF1,5 et 2,5 et avant 35 jours pour le pF 3,5.

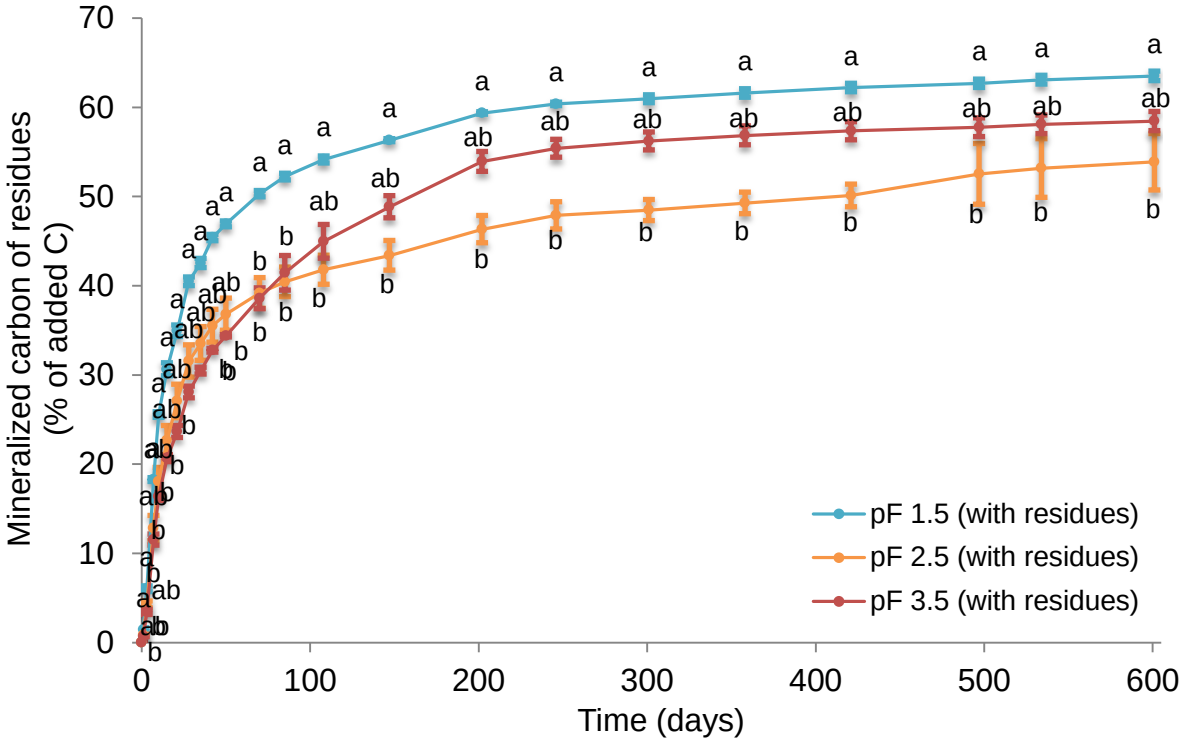


Figure 36 - Cinétiques de minéralisation du carbone issu des résidus (^{13}C-CO2) jusqu'à 601 jours. Les barres correspondent à l'écart type des réplicats et les lettres aux résultats des tests statistiques (Dunn test).

4.3.2. Minéralisation du C du sol et priming effect

La minéralisation cumulée basale (figure 37) présente des dynamiques similaires quelles que soient les teneurs en eau et en présence ou en absence de résidus. Plus la teneur en eau du sol augmente, plus la quantité de carbone du sol minéralisé est importante avec des différences entre les pF1,5 et 3,5 tout le long de l'incubation pour les sols contrôles comme pour les sols amendés avec des résidus. La minéralisation du carbone du sol varie entre 6,8% et 10,1% du C présent pour les sols témoins et entre 8,7% et 11,1% pour les sols amendés avec les résidus

après 601 jours. Au bout de 601 jours, l'écart entre l'ensemble des cosmes à pF1,5 et pF 3,5 est d'environ 3,3% du carbone minéralisé pour les sols témoins et 2,4% pour les sols amendés.

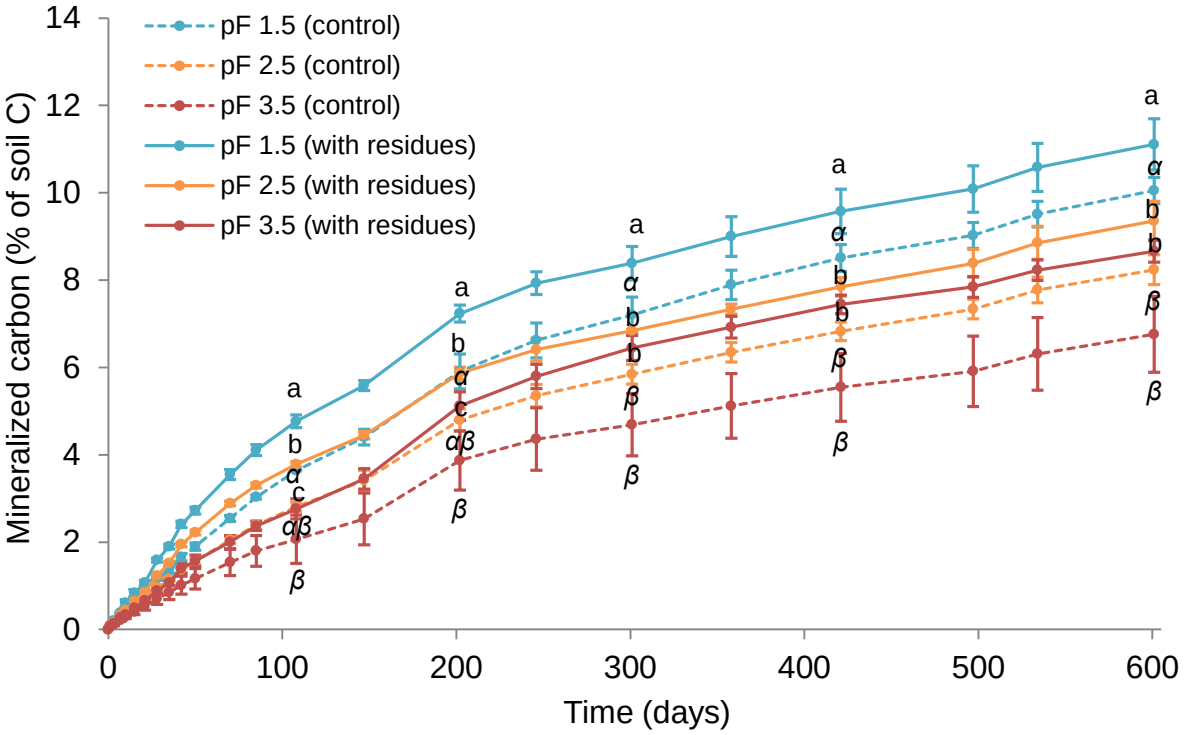
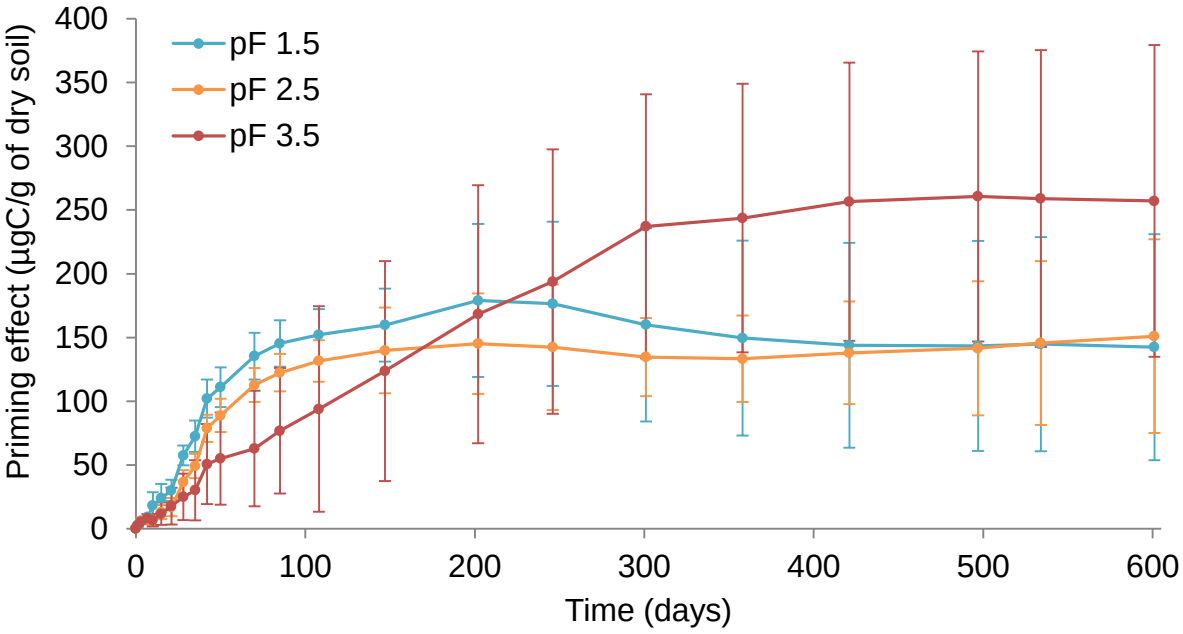


Figure 37 - Cinétiques de minéralisation du carbone du sol témoin et amendé en résidus sur 601 jours. Les barres correspondent à l'écart type des 3 réplicats et les lettres aux résultats des tests statistiques (Tukey test) entre les 3 pF (cosmes contrôles et avec résidus traités séparément).

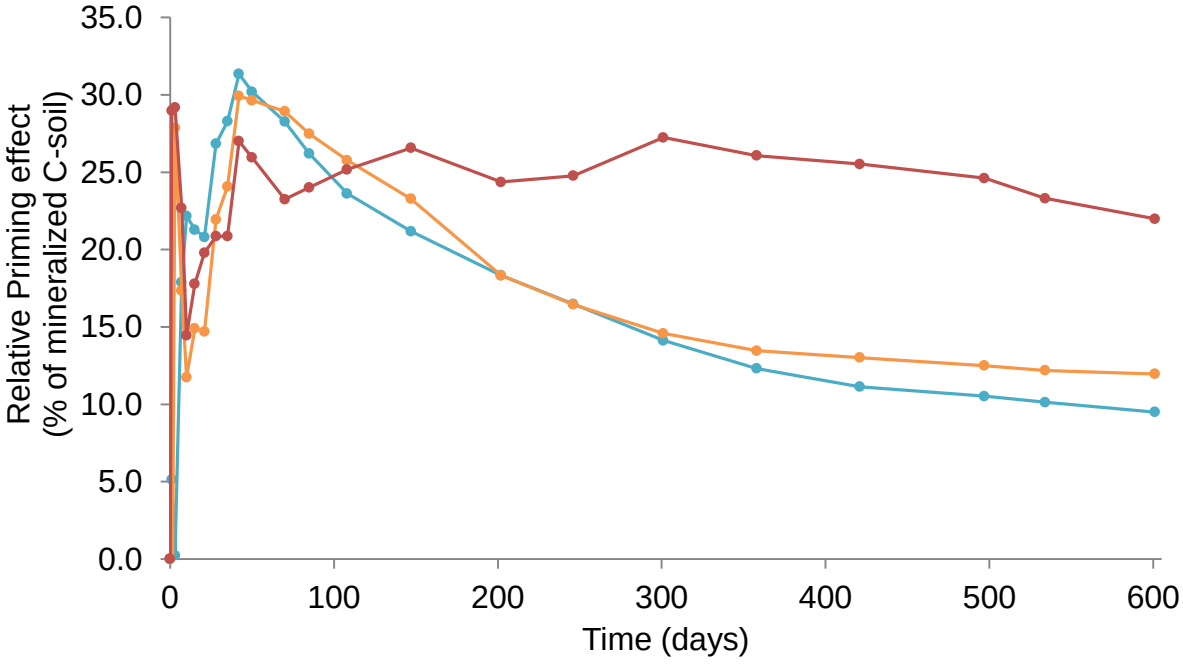
L'apport de résidus augmente et stimule la minéralisation du carbone du sol, ce qui met donc en évidence un "priming effect" (figure 38a). Cette stimulation est présente à toutes les teneurs en eau mais les cinétiques et les quantités maximales de C du sol minéralisées diffèrent. Dans les sols les plus humides (pF1,5 et 2,5), le priming effect est rapide puis s'atténue aux alentours de 75 jours pour représenter, après 601 jours, 1,1% du carbone du sol minéralisé. On peut ajouter qu'au premier jour d'incubation, le priming effect à pF2.5 est légèrement négatif (-0.007% du carbone du sol minéralisé) bien que ceci ne dure pas au-delà de cette date. Lorsque le sol est plus sec (pF3,5), le priming est dans un premier temps faible avant de dépasser le priming observé à pF1,5 et 2,5 après environ 200 jours. Le priming augmente linéairement jusqu'à 300 jours puis ralentit pour atteindre un plateau et représenter 1.9% du carbone du sol minéralisé.

Le priming effect relatif se caractérise par 2 pics quelle que soit la teneur en eau avec un

premier pic qui apparait après 3 jours pour les pF2,5 et 3,5 et qui correspond respectivement à 29,0% et 29,2% de sur-minéralisation et après 10 jours à pF1,5 et qui représente 22,2% de sur-minéralisation (figure 38b). Un second pic apparait pour les 3 humidités après 42 jours d'incubation et correspond à 31,4%, 29,6% et 27,0% de sur-minéralisation pour les pF1,5 ; 2,5 et 3,5 respectivement. Après 42 jours, le priming effect relatif à pF1,5 et 2,5 diminue progressivement jusqu'à atteindre 9,5 et 12,0% de sur-minéralisation à 601 jours d'incubation. A pF3,5 le priming effect relatif se stabilise après 70 jours d'incubation pour atteindre 22,0% de sur-minéralisation à 601 jours d'incubation.



(a)



(b)

Figure 38 - Cinétiques du priming effect cumulé (a) et du priming effect relatif au C du sol minéralisé (b) sur 601 jours. Dans le cas du priming effect, les barres correspondent à la déviation standard.

4.4. Discussion

4.4.1. Dynamique du priming effect induit par des apports de résidus complexes dans un sol à long terme

Nous avons mis en évidence un priming effect positif dont les ordres de grandeur sont cohérents avec ceux observés pour des apports de cellulose couplés à des apports d'azote dans un sol à pF2 (Fontaine et al., 2011) et des apports de paille de blé (Pascault et al., 2013). Ceci n'est pas surprenant étant donné la qualité des résidus apportés qui sont des résidus complexes avec un C/N de 19,6 et contenant plus de 30% de cellulose. L'intensité du priming effect augmente jusqu'à ≈ 70 jours (pF1,5 et 2,5) ou 300 jours (pF3,5), puis se stabilise. Sa durée est donc importante par rapport à la majorité des publications dans ce domaine (Luo et al., 2016) mais la plupart des études se focalisent sur les premières phases du priming effect. Néanmoins, il a été montré que le priming effect pouvait s'exercer sur des durées variables de quelques jours quand il est induit par des apports de matière organique dont la qualité et la quantité ne laissent pas le temps au phénomène de perdurer, entrainant un effet de déclenchement sans priming effect réel (Blagodatskaya et Kuzyakov, 2008), jusqu'à plusieurs semaines après les apports. Mais peu d'informations existent dans la littérature sur des durées supérieures à quelques mois. Cette expérience nous a permis de montrer que le priming effect pouvait durer sur des temps longs, à savoir au moins 10 mois en conditions sèches et 2 à 3 mois à pF1,5 et 2,5.

Par ailleurs, le priming effect relatif nous permet de constater que le phénomène montre deux pics d'intensité à deux moments différents quel que soit le pF. L'un à trois jours pour les pF3,5 et 2,5 et à 10 jours à pF1,5 et le second à 42 jours pour les trois pF. Le premier pic apparait rapidement après la mise en incubation et avant le pic d'activité des microorganismes. Ce priming effect pourrait être induit par la libération du carbone soluble des résidus et leur diffusion dans le sol adjacent, que nous montrons effectivement à ces dates en quantifiant le ^{13}C dans le sol adjacent (cf chapitre 3). Ce type de priming effect est considéré comme apparent (Kuzyakov, 2010). Les pics ayant lieu à 10 et 42 jours correspondent plus à un priming effect réel où la libération des composés organiques lors de la biodégradation du résidu voire lors de la mort des microorganismes ayant participé à sa biodégradation entraîne une stimulation des communautés microbiennes et une dégradation des matières organiques du sol (Kuzyakov et al., 2000). L'héterogénéité spatiale des

cosmes, les résidus y étant concentrés en une couche centrale, nous a permis de particulièrement bien distinguer et expliquer ces deux phases de priming effect.

4.4.2. Effet de l'humidité du sol sur le priming effect et sa dynamique

Jusqu'à 100 jours, le priming effect augmente avec l'humidité du sol. Ce résultat est cohérent avec notre hypothèse de départ qui stipulait que les activités des microorganismes du sol sont davantage stimulées dans un sol humide, l'eau permettant une diffusion plus importante des enzymes et des substrats et favorisant l'accessibilité. Par ailleurs, la décomposition des résidus de culture est d'autant plus importante entre 0 et 100 jours que l'humidité du sol est élevée. Une plus grande quantité de composés labiles est donc certainement libérée, stimulant l'activité des microorganismes. Différents auteurs ont ainsi montré que l'intensité du priming effect augmentait avec la quantité de MO labile apportée (Luo et al., 2016). Ce résultat est en revanche contraire à l'analyse de Luo et al. (2016) qui mettent en évidence une corrélation négative entre le priming effect et l'humidité du sol. Cependant, ces auteurs interprètent cette corrélation comme étant le résultat d'une stimulation des microorganismes plus importante à humidité élevée amenant à un épuisement des ressources (substrats, oxygène) très rapide et un ralentissement du priming effect précoce. Bien que le mécanisme proposé par ces auteurs ne semble pas expliquer la variation du priming effect avec l'humidité du sol avant 100 jours, ce mécanisme pourrait expliquer ce que nous observons au-delà de 100 jours. En effet, en conditions humides (pF1,5 et 2,5), le priming se stabilise au-delà de 100 jours quand la minéralisation cumulée du carbone des résidus atteint un plateau (figure 26). En conditions sèches, le priming effect continue à augmenter après 100 jours alors que la minéralisation cumulée du carbone des résidus continue à augmenter : des composés labiles sont encore libérés dans le sol, par la décomposition des résidus. En fin d'incubation, on quantifie 1.7 fois plus de priming effect après 601 jours à pF3,5 qu'à pF1,5 et 2,5.

La minéralisation basale est également considérée comme étant un indicateur du potentiel d'impact du priming effect (Luo et al., 2015). Pour les trois humidités étudiées, la minéralisation basale n'est pas la même et est plus faible lorsque le pF augmente. Or Luo et al. (2015) affirment que plus la minéralisation basale est faible, plus le priming effect est potentiellement important.

En conditions sèches, les transferts de C soluble issu des résidus dans le sol sont lents et pourraient être comparés avec ce qui se passe dans la rhizosphère. Le relargage lent, en petite

quantités d'exsudats dans le sol par les plantes peut limiter le développement des stratèges-r par rapport à un relargage rapide et important et ainsi favoriser le développement des stratèges K et donc la minéralisation des matières organiques du sol (Fontaine et al., 2003). Ainsi, un apport plus faible et progressif des matières organiques en conditions sèches pourrait avoir le même résultat, à savoir favoriser le priming effect sur le long terme.

Le priming effect n'est pas proportionnel à l'humidité du sol. En effet, on remarque très peu de différences de priming effect dans le temps entre les pF1,5 et 2,5 en termes de dynamique et de quantité de carbone du sol minéralisé. Le priming effect à pF3,5, est en revanche, plus lent mais plus important après 601 jours. Les résultats observés suggèrent qu'il existe un seuil d'humidité au-delà duquel le priming effect observé est fondamentalement différent, avec des mécanismes sous-jacents différents.

4.4.3. Rôle des communautés microbiennes sur la dynamique à long terme du priming effect

De nombreuses études affirment que le priming effect observé en début d'incubation et de forte intensité serait le résultat de la dégradation des composés facilement dégradables par les organismes du sol correspondant aux stratèges-r entrainant une consommation rapide des ressources apportées (Luo et al., 2016). Selon la quantité apportée, le priming effect dure plus ou moins longtemps (Blagodatskaya et Kuzyakov, 2008). Dans notre cas, les transferts en carbone soluble des résidus vers le sol dans les premiers jours ont pu favoriser l'activité de ce type de microorganismes (principalement des bactéries) et une dégradation rapide des composés solubles jusqu'à leur épuisement. Dans un second temps, les matières organiques plus complexes résiduelles ont pu être à l'origine d'une compétition entre bactéries et champignons ; la croissance lente de ces derniers ne leur permettant pas de contribuer significativement à la biodégradation des matières organiques simples durant les phases précoces de biodégradation.

Ce type de succession entre stratèges de type r, avec des capacités de croissance et de renouvellement rapides, et stratèges de type K (et notamment les champignons), dont la croissance est plus lente (Bastian et al., 2009; Fanin et al., 2019), est considéré comme pouvant induire un priming effect (Fontaine et al., 2003; Poll et al., 2008). Blagodatskaya et Kuzyakov (2008) concluent également que les phases initiales du priming effect découlent d'une réponse rapide des bactéries après un apport quand les champignons sont eux responsables des phases suivantes. Les champignons et les organismes oligotrophes en

général, sont les acteurs principaux du priming effect car leurs capacités de dégradation plus importantes leur permettent de s'attaquer aux matières organiques complexes et de produire une plus grande diversité d'enzymes par rapport aux organismes copiotrophes (Fontaine et al., 2003, 2011). Les enzymes produites et libérées dans le sol peuvent s'attaquer par la même occasion aux matières organiques du sol et participer à leur dégradation (Fontaine et al., 2003). De plus, le mode de colonisation des champignons *via* les hyphes est favorable au priming effect en augmentant la mise en contact des champignons avec les substrats présents dans le sol (Fontaine et al., 2011).

Dans notre cas, la dynamique du priming effect en conditions sèches, très différente des conditions plus humides, avec une première phase lente et progressive jusqu'à 300 jours et atteignant des valeurs finales fortes de l'ordre de 22% du C du sol pourrait s'expliquer par le rôle important des champignons et notamment dans les phases plus tardives. De plus, la dégradation du résidu observée en fin d'incubation plus forte à pF3,5 qu'à pF2,5 peut également être attribuée aux champignons. Bien que nous n'ayons pas pu réaliser d'analyses de PLFA au-delà de 45 jours, nous avons observé à cette date une abondance relative des champignons plus grande à pF3,5 qu'à pF2,5 et 1,5 (chapitre 3). En conditions sèches, les champignons pourraient être les acteurs principaux de la biodégradation des résidus de par leur capacité à coloniser leur milieu et leurs capacités à dégrader des macromolécules végétales.

4.5. Conclusion

Les incubations avec des résidus de maïs apportés sous forme d'une couche centrale dans des cosmes de sol sur plus de 1,5 an nous ont permis de mettre en évidence un priming effect sur des temps longs, entre 2,5 et 10 mois selon les conditions d'humidité du sol. Nous avons mis en évidence, pour la première fois à notre connaissance, une forte modulation du priming effect par l'état hydrique du sol. Jusqu'à 100 jours, le priming effect est d'autant plus important que l'humidité du sol est grande, mais à partir de cette date, le priming effect en conditions sèches devient plus important. La phase initiale du priming effect semble directement en relation avec les transferts de carbone soluble dans le sol et la stimulation des activités bactériennes alors que les phases ultérieures dépendent du développement plus lent de microorganismes spécialisés dans la dégradation des matières organiques plus complexes

comme les champignons qui jouent un rôle d'autant plus important que les conditions sont sèches. Cette hypothèse mériterait d'être testée en quantifiant l'abondance des champignons en fin d'incubation.

Chapitre 5 : Méthodes et limites pour visualiser les microorganismes et leurs activités dans les habitats microbiens du sol

Chapter 5: Methods and limits in imaging microorganisms and their activities in soil micro-habitats

5. Methods and limits in imaging microorganisms and their activities in soil micro-habitats

5.1. Introduction

In soils many phenomena that are observed are measured at the profile or at the plot scale but determined by microscale conditions and processes. Indeed, because the most reactive soil constituents, like clay and organic matter, are small and because microorganisms also have micrometric dimensions, biochemical interactions occur at the scale of the microhabitat. In addition, soil is an extremely complex and heterogeneous environment and the distribution of soil constituents is not the same everywhere at such scale (Chenu and Plante, 2006; Peth et al., 2014). Therefore, the local environment of microorganisms may strongly differ a few millimetre apart, or even less (Chenu et al., 2001; Ranjard and Richaume, 2001; Chenu and Stotzky, 2002; Raynaud and Nunan, 2014).

Models based on bulk soil analysis and currently used to describe the soil functioning are limited due to a weak understanding of phenomena occurring at microscales (Baveye et al., 2018) and, at the moment, soil fractionation is the main used approach to study soil but it gives information in a limited scale range which does not include microhabitat.
New models taking into consideration microscale soil functioning appear (Monga et al., 2008; Pot et al., 2015; Portell et al., 2018; Kemgue et al., 2019). The need for data at relevant spatial scales such as physical structure of soil, chemical characteristics, microorganisms distribution, identification, and detection of their activities in soil is therefore important to overtake soil science challenges (Moyano et al., 2013).
Then, visualising soil microorganisms in undisturbed soil samples is a very useful approach to study biodegradation in soil by getting information on their habitat, on the local conditions experienced and on their accessibility to local resources or to other microorganisms.

However, visualization methods of soils at a fine scale represent challenges as soils are heterogeneous organo-mineral materials, made essentially of very small particles in the sub-millimetre range, that are hydrated and which structure is strongly affected by moisture state. Several methods have been used to that end for the last 30 years, but there is a recent development of methodologies and of studies in this area. New methods are now able to give

much more information than before, not only by reaching better resolution images but also allowing having access to the third dimension of space or to much better inform on soil chemical or biological characteristics in the visualised areas.
However, imagery methods are still poorly considered in soil sciences for the reasons that they are not always known and also not always easy to implement. Soil samples can be very different from one to another and not all methods are relevant for all kind of preparation or scientific question. Several visualisation methods require access to complex and not widespread instruments.
To our knowledge no review is available to help scientists to select the most appropriate method, given their scientific questions and the limits and possibilities offered by the different methods available.

The aim of this review is to describe the visualization methods currently available to gain information on microorganisms and their activities at the microscale in their soil environment. We review and present different methods in that allow (i) localize microorganisms in their habitat, (ii) identify the different types of microorganisms, (iii) gain information on the activity of microorganisms and (iv) inform on the characteristics of their immediate environment. We systematically specify the spatial resolution of the methods, the preparation techniques and quantification possibilities. We address the limits of the different methods, the possibilities to combine them and discuss perspectives in the field.

5.2. Visualizing microorganisms in their habitat

5.2.1. Localizing microorganisms

There are different methods for localizing microorganisms in soil samples and for identifying them as bacteria or fungi (Table 3). Distinguishing microorganisms from other soil particles is not always easy. The main identification criteria are shapes and sizes: rounded shapes, filamentous forms, or the structure of the cell, which may be combined with general or specific stains.

Table 3 - Observation methods to localize microorganisms in soil samples

Methods	Resolution	Visualisation criterion	Samples size	Dimension	References
Light microscopy	mm – 200 nm	Shape, contrast (+ staining or labelling)	cm	2D	-
Fluorescence microscopy	mm – 200 nm	Shape, contrast (+ staining or labelling)	cm	2D or 3D (confocal)	Postma and Altemüller (1990); Morgan et al. (1991); Baschien et al. (2001); Nunan et al. (2001); Schmidt and Eickhorst (2014); Schmidt et al. (2018)
Scanning electron microscopy (SEM)	100 µm – 1 nm	Shape, topography	mm – cm	Surface 3D	Gaillard et al. (1999); Chenu et al. (2001); Schmidt et al. (2012)
Transmission electron microscopy (TEM)	100 µm – 0,05 nm	Shape, contrast (+ staining or labelling)	mm – cm	2D	Chenu and Plante, (2006)
Atomic force microscopy (AFM)	10 – 20 nm	Topography, resistance	mm	Surface 3D	McMaster, (2012); Huang et al. (2015)

At the extremes in terms of resolution (magnification up to circa x200), binoculars allow the observation of fungi, identified as such thanks to their shape, size or even their colour, while bacteria and archea are too small for binoculars. Soil samples are observed without any special preparation as fresh objects can be directly observed.

The resolution limit of light microscopy, imposed by the diffraction of light, is around 200 nm, which allows for the observation of objects between 10^{-3} and 10^{-7} meters (Ranjard and Richaume, 2001) in preparations between slide and coverslip or in thin sections after inclusion in a resin.

Epi-fluorescence microscopy, combined with the use of stains, i.e. fluorochromes, makes it possible to distinguish the target organisms from the background and therefore locate and enumerate bacteria (Fig. 39) (Nunan et al., 2001) and fungi (Baschien et al., 2001) in 2D and even in 3D when using confocal microscopy (Li et al., 2004). Several fluorochromes specifically stain cell constituents (Table 4). The main difficulties in using them are due to unspecific staining, in particular in the case of positively charged fluorochromes, such as acridine orange, and to the background due to the autofluorescence of soil organic particles (Altemüller and Van Vliet-Lanoe, 1990; Li et al., 2004). Figure 29 show a case where such

kind of autofluorescence has been identified (red arrow) making more complicated the identification of microorganisms. Provided their excitation spectra are not superimposed, and no interferences occur, it is possible to use several staining agents simultaneously (Chen et al., 2007). In addition, the quality of the staining can be affected by the presence of clay particles

as stains tend to adsorb to clay surfaces resulting in a fluorescence which can hinder the observation of microorganisms (Li et al., 2004). Other factors may also interfere with the staining such as its concentration, soil pH and the type of resin used (Altemüller and Van Vliet-Lanoe, 1990; Postma and Altemüller, 1990).

Such methods allowed Nunan et al. (2002) to identify soil microorganisms and to study their spatial organization. They found that microorganisms were not organized in the same way and at the same spatial scales depending on the depth of sampled soil.

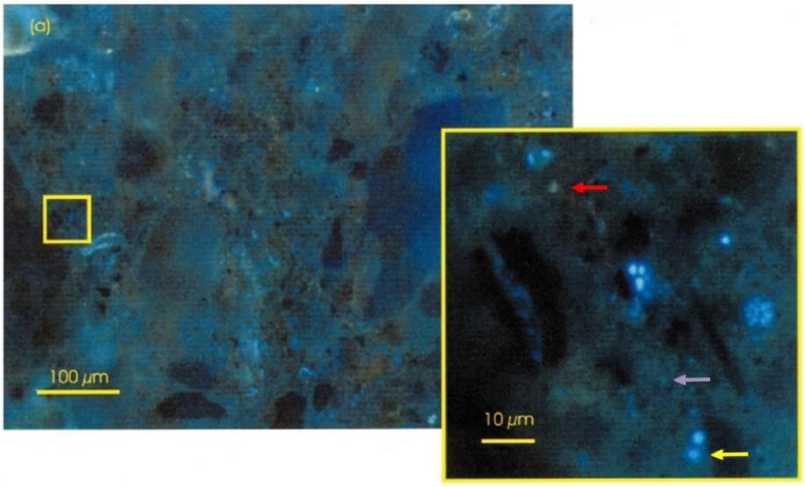


Figure 39. Example of composed image coming from different thin sections stained with CalcoFluor White and observed with an epifluorescence microscope. The yellow arrow indicates a not fully focused bacteria but still identified by the image post processing, the red arrow indicate the presence of auto fluorescence and the purple arrow indicate a too tiny element to be clearly identified even with the post processing. Images: Nunan et al. (2001).

Table 4 - Staining and imagery methods to localize microorganisms in soil.

Target	Stains	Acquisition methods	References
Nucleic acids	Acridine orange, SYBR Green I, DAPI, Europium chelate	Epifluorescence or confocal microscopy	Postma and Altemüller (1990); Schlüter et al. (2019)
Proteins	FITC		Chen et al. (2007)
Polysaccharides	Phenol aniline blue, Phenolic tryptophan blue, DTAF, Calcofluor White		Morgan et al. (1991); Nunan et al. (2001); Chen et al. (2007)

The study of microorganisms in their environment requires the preservation of soil structure and of the spatial relationships between the microorganisms and the soil matrix. This can be achieved observing thin sections of soil samples previously embedded in resin, as described by Li et al. (2004). This type of preparation requires fixation, dehydration and resin impregnation before cutting the thin sections (Nunan et al., 2001; Li et al., 2004), paying attention to the preservation of the arrangement of soil particles that exists in moist soil samples and of the integrity of biological cells. The staining needed to visualize microorganisms can be carried out either before the impregnation, by immersion of the sample in a staining bath, usually after a fixation step (e.g. Fig. 39), or after. However, only microorganisms situated at the surface of the thin section can be stained and visualized in the latter case.

There are methods to overcome the resolution limits of light microscopy. Super resolution techniques such as STED (stimulated-emission depletion microscopy), SIM (structured illumination microscopy) or SMLM (single molecule localization microscopy) methods allow resolutions up to a few tens of nanometers to be achieved with thin sections (Turkowyd et al., 2016). With the use of STED, the sample is scanned using two lasers. The first one stimulates the emission of fluorescence subjected to diffraction on a targeted zone and the second in the form of a "donut" uses a de-excitation beam and comes to switch off a part of the emission of the fluorochrome leaving only its central emission allowing to counterbalance the effects of the limit of diffraction and reach a resolution between about 20-70 nm. As this method is based on activation and successive repeated extinction of fluorochromes, all fluorochromes must be photo-stable (Turkowyd et al., 2016).

The SIM method uses a mask containing a pattern of lines regularly spaced with a frequency, orientation and phase known, rotating above the sample to achieve a controlled illumination of the fluorochrome. The exploitation of the "moiré" effect obtained by this approach makes it possible to reconstruct the structure of the observed object at a resolution of approximately 80-100 nm. This method has the advantage of not having requiring the use of particular kind of stains (Turkowyd et al., 2016).

Finally, the SMLM (single molecule localization microscopy) methods use the blinking of certain fluorochromes to isolate them one by one via their isolated emissions, allowing very small resolutions to be obtained between 10 and 50 nm. Here the fluorochromes must be photo-convertible and photo-stable (Turkowyd et al., 2016).

These methods are very sophisticated and the density of the staining, the type and the size of the fluorochrome used strongly impact the final result (Huang et al., 2009). The SIM and SMLM methods also require a time-consuming post-processing of images that hinders their use. In view of their complexity and novelty, these methods are not yet used in soil science but are in cell biology and chemistry.

Scanning and transmission electron microscopy allow getting much finer resolutions (Table 3) (Fig. 40). It is possible to reach resolutions of circa 20 nm with SEM and 0.5 nm with TEM. Preserving the soil wet state microstructures and the integrity of organisms and organic constituents despite the high vacuum to which the sample is exposed in the microscope is a challenge and requires using specific preparation methods. For SEM the samples are in most soil science studies air-dried, while it strongly affects all hydrated structures and damages biological features, e.g. bacterial cells appear flattened, or can be observed directly in the moist state without any conducive coating using an Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM) (Gleeson et al., 2005), though with a poorer quality images in terms of resolution and contrast (Lin and Cerato, 2014), or observed with a Low Temperature Scanning Electron Microscope after fast freezing (Chenu and Tessier, 1995). Regarding TEM, if one wants to visualize soil microhabitats samples cannot be simply deposited on TEM grids as a suspension but have to be embedded in a resin, from which ultrathin sections are prepared. As for fluorescence microscopy, the soil samples need first to be fixed, dehydrated and impregnated with a resin. These methods have been adapted from biology to soils to account for soil specific characteristics (Villemin and Toutain, 1987; Villemin et al., 1995;

Elsass et al., 2008). With SEM soil microorganisms are only identified, and it is often challenging, through their shape, while in soil thin sections prepared for TEM, the use of contrasting agents and stains (such as osmium tetroxide, uranium acetate, lead citrate or more specific stains) allows to enforce the shape and structure identification, e.g. by visualizing the cell wall structure. SEM and TEM can be used to characterize the interactions between microorganisms and the surrounding minerals or aggregates (Chenu et al., 2001) or organic matter (Gaillard et al., 1999) (Fig. 40).

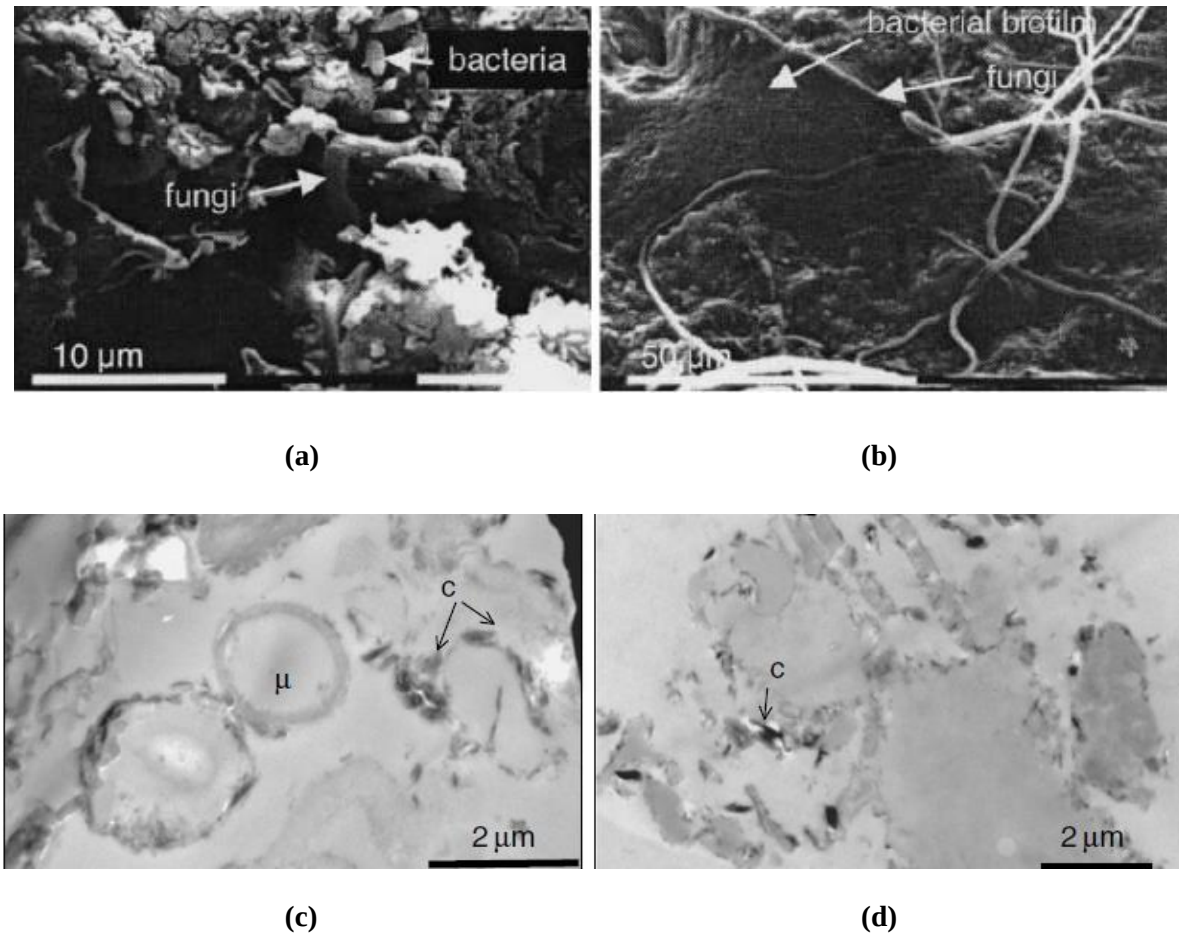


Figure 40 - Microorganisms observed, with Low Temperature SEM, inside (a) and at the surface (b) of micro-aggregates of soil. Images: Chenu et al. (2001). Observations of microorganisms, with TEM, in a forest (c) and cultivated (d) soil after inclusion in a resin and preparation of ultrathin sections (µ= microorganisms, c= clay). Images: Chenu and Plante (2006).

Atomic Force Microscopy (AFM) has been little used for soils, while it allows to identify microorganisms by visualizing their topography at very fine scales, thanks to a stylus which moves vertically with a vertical resolution of a few Å (Binnig et al., 1986). It requires fewer

preparation treatments of the samples than electron microscopy (Kherlopian et al., 2008), however it requires a flat surface at the base and small objects. It has thus not been used on soil samples but rather on model systems, e.g. to study the adhesion of bacteria to clay mineral surfaces with separated kaolinite, montmorillonite and goethite particles (Lower et al., 2001; Huang et al., 2015) and to study the weathering of biotites and chlorites by mycorrhizae (McMaster, 2012).

Several of the methods presented here only allow visualize soil microorganisms in soil fabrics in 2D. 3D localization is possible either thanks to the depth of field of the microscope (binocular magnifier, SEM) (Fig. 40), by reconstituting the sample in a non-destructive way (confocal microscopy), by progressively abrading the sample with a focused ion probe (FIB) (Berleman et al., 2016; Vidal et al., 2018), or by reconstitution from thin sections or superimposed serial block face (SBF) sections or broad ion beam (BIB) but it has been mainly used for now on geo-materials (Desbois et al., 2010; Houben et al., 2013; Hemes et al., 2015). X-ray micro-tomography does not currently allow the localization of microorganisms in a soil sample for two reasons: the resolution is often insufficient and it would necessitate increasing the contrast to distinguish organic matter, including microorganisms, from mineral phases.

5.2.2. Identifying the microorganisms

A further step is identifying the microorganisms as belonging to a given taxonomic group. Shape and size might be enough with SEM and fluorescence microscopy to distinguish bacteria from fungi and the cell wall structure can permit the same in TEM, but these observation tools do not allow to differentiate archaea or actinomycetes from bacteria, nor to differentiate more finely bacterial or fungal groups.

Specific methods allow the *in situ* identification of microorganisms on a taxonomic or functional level. The use of stains coupled with morphological identifications makes it possible to distinguish certain microorganisms from each other, but rarely in the soil environment which often interferes with the dyes. Methods based on fluorescence in situ hybridization (FISH) allow to target and distinguish more precisely microorganisms. The general principle of FISH is to use an oligonucleotide probe coupled to a fluorescent marker which will bind to a specific sequence of RNA within the microbial cell, allowing it to be

targeted. It is therefore a method which is used in epi-fluorescence microscopy (Schmidt and Eickhorst, 2014) and in confocal microscopy (Muggia et al., 2013) after application of the stain and impregnation of intact soil samples (Eickhorst and Tippkötter, 2008a).

Specific probes to distinguish gram positive and gram negative bacteria or bacteria and fungi have been developed (Baschien et al., 2001; Eickhorst and Tippkötter, 2008b, 2008a), and a higher taxonomic resolution could be achieved by targeting more specific sequences of certain functional groups of microorganisms (Torsvik and Øvreås, 2002).

The main limitations of FISH are the variability in detection of targeted microorganisms (Bouvier and Del Giorgio, 2003) as well as the importance of background noise due to non-specific fixation of the stains on other soil particles, which explain that FISH has been little used so far on soil samples like for example in the study of Rogers et al. (2007). For the sake of optimization, different probes have been developed, making it possible (i) to amplify the signal (e.g. catalysed reporter deposition FISH or CARD-FISH (Kubota, 2013; Juyal et al., 2018; Schmidt and Eickhorst, 2014; Schmidt et al., 2018), (ii) to increase the resolution by allowing observations via SEM using GOLD-FISH (Schmidt et al., 2012), and (iii) to limit unspecific staining or at least detect it (e.g. NON338 or NONEUB probe complementary to the EUB338 probe and serving as a negative control for non-specific labelling (Eickhorst and Tippkötter, 2008a) (Fig. 41).

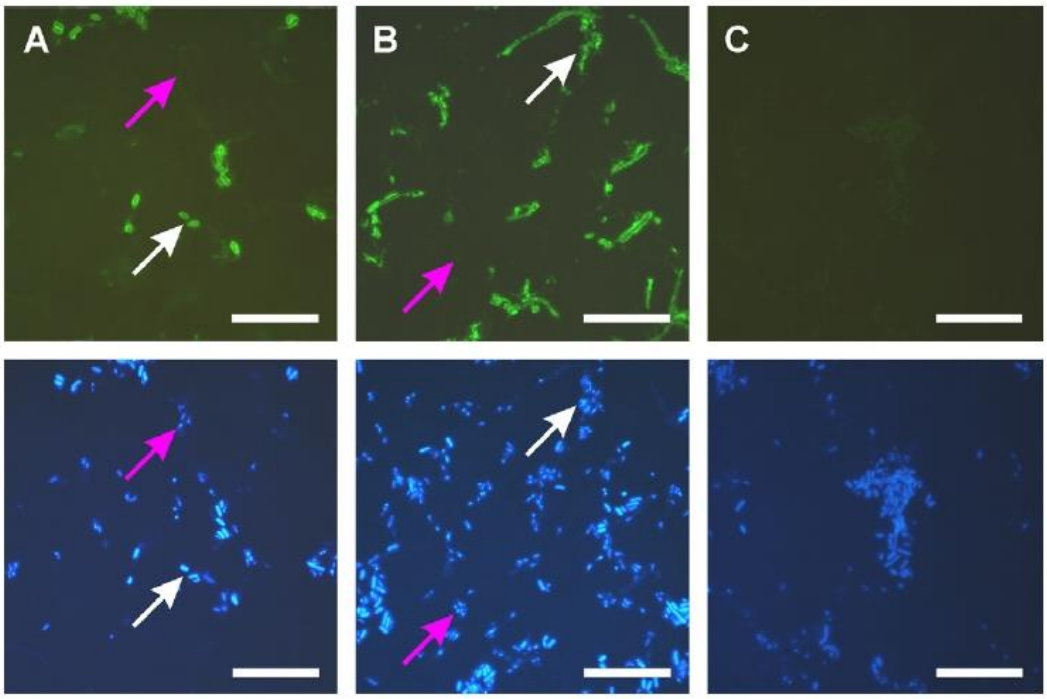


Figure 41 - Microorganisms observation (E. coli strain, targeted by GAM42a probe and AK199 strain, targeted by ROS537 probe) after staining with Gold-FISH technique and using probes GAM42a (A), ROS537 (B) and NONEUB (as negative control probe) (C). On the top: observation of the Gold-FISH signal; on the bottom: observation with DAPI. White arrows: targeted cells; pink arrows: non-targeted cells. Scale bar : 20µm. Images: Schmidt et al. (2012).

5.3. Microscale information on the activity of microorganisms

A range of methods has been developed to gain information on the *in-situ* activity of soil microorganisms. Here we focus on the ones that are compatible with the visual observation of soils. Characterizing *in-situ* the activity of soil microorganisms can be separated into (i) methods that give general information on their physiological state, using markers, (ii) *in situ* demonstration of substrate uptake, using tracers, and (iii) visualization of extracellular enzymes.

5.3.1. Visual information on the physiological state of soil microorganisms

Several physiological states of microorganisms may be distinguished. While dead microorganisms are in an irreversible state in which no growth, cell elongation, nor protein synthesis can take place, active microorganisms are, as defined by Blagodatskaya and Kuzyakov (2013), « the portion of total microbial biomass that i) is involved in current utilization of substrates, ii) readily responds to substrate input e.g., by respiration, producing enzymes, or iii) is growing and reproducing ». The dormant state of soil microorganisms is that of microbial cells exhibiting strongly reduced physiological activity, e.g., resting cells forming spores or cysts. Dormant microorganisms may switch more or less rapidly from inactive/dormant state to activity, as emphasized by Blagodatskaya and Kuzyakov (2013).

These different physiological states can be observed *in situ* by microscopy using fluorescent markers. Targeting microorganisms (bacteria and fungi) by labelling some of their components (nucleic acids, proteins or polysaccharides) can be used to distinguish their states directly or indirectly.

Specific markers allow the direct visualization of active organisms, such as Fluorescein Diacetate (FDA), 2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride (INT), 5-cyano-2,3-ditolyl-tetrazolium chloride (CTC), because of their enzymatic oxidation or hydrolysis by active cells (Table 5). On the other hand, propidium iodide (PI) allows to visualize dead microorganisms because damaged cells-wall are PI permeable, while alive ones are PI impermeable (Table 5). These stains have to be combined with general fluorochromes for microorganisms, such as DAPI or Calcofluor White (Table 4), to both localize the microorganisms and infer their physiological state (Blagodatskaya and Kuzyakov, 2013). However, these methods should be used with caution as for example cells that would be dead but still intact would not be marked by PI (Maraha et al., 2004). In addition, these labelling techniques have limits, in particular with regards to their efficiency and selectivity within a soil matrix including non-specific labelling or physical limitations for the marker to accessing its target as shown by Herrmann et al. (2007a), but they generally allow a good estimate of these different categories of activities (Blagodatskaya and Kuzyakov, 2013).

Table 5 - . Imagery methods to characterise the activity of microorganisms in soil.

Activity	Sought informations	Methods	Acquisition methods	References
Physiological state	**Dead microorganisms with altered membranes**	**Staining** with Propidium iodide (PI)	Epifluorescence or confocal microscopy	Maraha et al. (2004)
	Active microorganisms	**Staining** with INT, CTC, FDA		Maraha et al. (2004); Busse et al. (2009)
	Dormant microorganisms	**Staining** Total – (Active + Dead microorganisms)		Maraha et al. (2004)
Assimilation	**Metabolically active microorganisms**	**Autoradiography**	Light and electron microscopy	Lee et al. (1999); Ouverney and Fuhrman (1999)
		TOF (Time of flight)-SIMS, NanoSIMS	Scan with mass spectrometer	Cliff et al. (2002); Herrmann et al. (2007a); Vidal et al. (2018)
Enzymatic activity	**Metabolically active microorganisms**	**Zymography**	Gel applied on the soil sample surface	Spohn and Kuzyakov (2013); Razavi et al. (2016); Sanaullah et al. (2016); Spohn et al. (2013)

5.3.2. Visualizing the assimilation of substrates by soil micro-organisms

Physiologically active heterotrophic microorganisms assimilate organic substrates and hence, visualization of this assimilation is one way to locate them. If a labelled compound is added to a soil sample at time 0, its location inside a microbial cell at t time means that this microorganism is active.

Once microorganisms can be detected, one long-known option is to use radioisotope labelled substrates and autoradiography: when placed in contact with an emulsion or a photographic film the radioactive source will imprint it and therefore the zones of substrate assimilation can be localized in thin sections (Torsvik and Øvreås, 2002; Kuzyakov and Blagodatskaya, 2015). This methodology can be used at scales ranging from cm-mm. It has allowed for example to visualise the transfer of ^{14}C photosynthates from *Pinus* roots to mycorrhizae in rhizoboxes with ^{13}C (Leake et al., 2001), ^{32}P (Lindahl et al., 1999) and ^{33}P (Wu, 2014), and to localize methanotrophs assimilating ^{14}C-CH_4 according to soil depth and aggregates size in an afforestation chronosequence on subalpine pasture (Karbin et al., 2017). Autoradiography can be applied to much smaller scales when combined with electron microscopy: micro-autoradiography but this has very seldom been applied to soils (Lee et al., 1999; Rogers et al.,

2007). Radioisotopes based methods are very sensitive allowing to work at low abundances but they demand very strong safety constraints compared to stables isotopes.

Similar information can be obtained using substrates labelled with stable isotopes and Secondary Ionization Mass Spectrometry (SIMS). There are several types of SIMS: static SIMS or Time of flight SIMS (TOF-SIMS) and dynamic SIMS, CAMECA or nanoSIMS, which are so called according to their operating modes (Myrold et al., 2011). A primary ion beam (usually Cs^+ for samples of organic matter, or O^-) is used to sputter the sample surface and release secondary ions which are collected, separated and analysed. These secondary ions are characterized using a mass spectrometer for dynamic SIMS and a time-of-flight mass spectrometer for static SIMS (Myrold et al., 2011). Scanning the sample makes it possible to obtain an elementary and isotopic map of the soil sample at very fine resolutions, i.e., less than 100 nm. This, combined with the high sensitivity of the analysis allows for the simultaneous study of soil micro-habitats and of the associated microbial activities (Herrmann et al., 2007b). Cliff et al. (2002) early visualized with TOF-SIMS the assimilation of ^{15}N and ^{13}C by bacteria and fungi grown in a model soil system made of kaolinite. It was possible with SIMS techniques to monitor the fate of labelled organic substrates in wheat rhizophere (e. g. Vidal et al. (2018)) or potentially the fate of inorganic nutrients like phosphatic fertilisers as proposed in a review of Herrmann et al. (2007b) and to visualize where they are assimilated by microorganisms within a soil sample as shown in Fig. 42.

However, like many recent techniques, SIMS remains associated with still heavy technical constraints. In particular regarding the sample preparation: the samples must be dry, stable, conductive, flat and resistant to a very high vacuum (Herrmann et al., 2007b). Hence, samples are usually embedded in an epoxy resin which signal background has to be removed as they also contain carbon (Mueller et al., 2013). In addition, the method is relatively destructive since the ion beam sputters its surface. While quantitative isotopic abundances are usually obtained with nanoSIMS, quantitative elemental analyses are more complicated to obtain for the reason that adequate standards are needed (Mueller et al., 2013). Finally, the field of vision observable with nanoSIMS is very limited (from 5 to 50 µm), which makes it very difficult to identify the areas of interest (Herrmann et al., 2007b). This suggests that when the spatial scales targeted are between 100µm and 1cm TOF-SIMS should rather be used (Myrold et al., 2011).

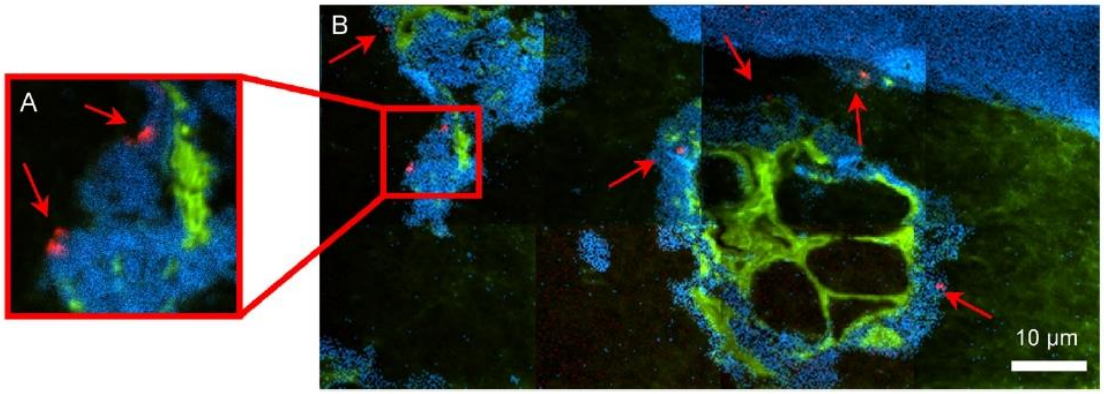


Figure 42 - Section of a *Pseudomonas fluorescens* colony in a soil after addition of ^{15}N. The cells that have assimilated the ^{15}N are visualized in red. (A) surimposed NanoSIMS images (in blue:$^{28}Si^-$, in green: $^{12}C^{14}N^-$ and in red: Ratio $^{15}/^{14}N$). (B) Mosaic of surimposed NanoSIMS images following the same caption. Red arrows indicate *Pseudomonas fluorescens* labelled in soil. Images: Herrmann et al. (2007b).

No technique can visualize microorganisms and their activities in 3D today. However, the positron emission tomography (PET) which makes it possible to locate isotopes in a sample is a promising approach. Garbout et al. (2012) used this method and visualized the allocation of assimilated ^{11}C-CO_2 by a plant. However, the isotope used there being very unstable (^{11}C has a half-life of 20.4 min), it limited the observation times and although commonly used in the medical sciences field, this technique which does not require any particular preparation is very little used in soil science. In addition, the resolutions obtained so far are very low, i.e. in the order of a millimetre, which makes this methodology hardly applicable to investigate microorganisms in soils.

5.3.3. Visualizing the enzymatic activity of soil microorganisms

Finally, a third way to characterize the activity of microorganisms *in situ* is to visualize their production of extracellular enzymes. Zymography, a still very recent method (Pedersen et al., 2015) and used by a limited number of research teams (Spohn and Kuzyakov, 2013; Spohn et al., 2013; Spohn and Kuzyakov, 2014; Razavi et al., 2016; Sanaullah et al., 2016; Ma et al., 2017; Guber et al., 2018), makes it possible to obtain images of the spatial distribution of enzymes on the surface of a soil sample. It works using a gel or membrane that contains a substrate which changes colour when it comes into contact and reacts with a specific enzyme.

When the film is placed on the surface of a soil sample, colour zones signal the presence of the targeted enzyme in the soil sample, at its surface (Guber et al., 2018; Razavi et al., 2019) .

Although the methods showed some improvements since its development, it still gives access only to relatively low resolutions (≈ 100µm). However, this technique enabled the identification of hotspots of activity of numerous enzymes (Kuzyakov and Blagodatskaya, 2015; Heitkötter and Marschner, 2018). It has allowed to obtain sufficient images to visualise the distribution of some enzymes at the rhizobox scale (Spohn and Kuzyakov, 2013; Spohn et al., 2013; Razavi et al., 2016; Liu et al., 2017) (Fig. 43). Heitkötter and Marschner (2018) demonstrated that microbial hotspots of activity, revealed by zymography, represented less than 3% of subsoil cores surface area, but after spraying glucose on these core surfaces the enzymatic activity dramatically increased outside of these initial hotspots, demonstrating the activation of initially dormant microorganisms by glucose.

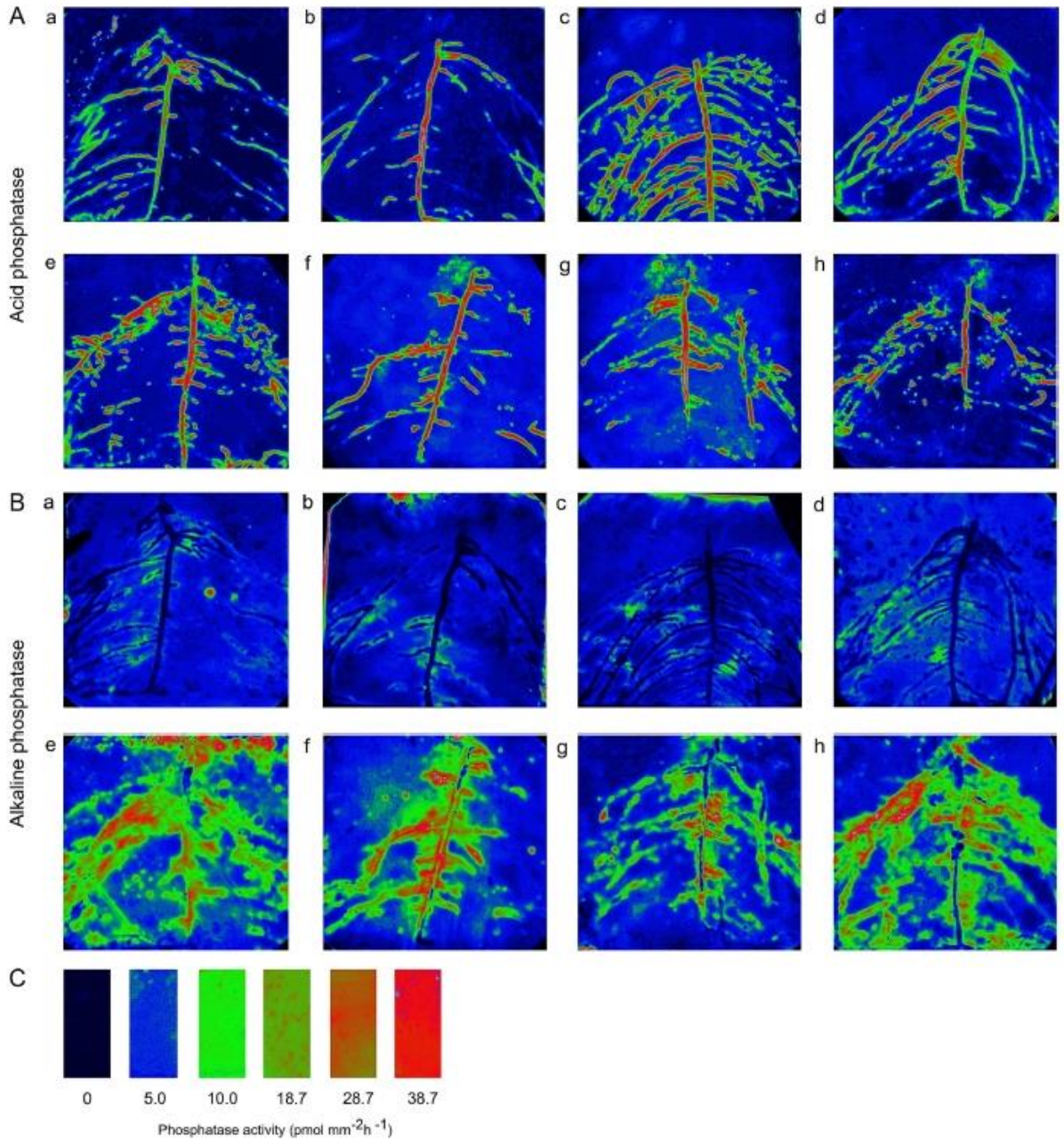


Figure 43 - Zymograms showing the activity of phosphatase enzyme around a root system in an amended soil (a, b, c, d) and control soil (e, f, g, h) with (A) acid phosphatase enzyme and (B) alkaline phosphatase with (C) as calibration membranes. Each image measure 12 x 11 cm. Images : Spohn et al. (2013)

5.3.4. Combinatorial approaches

In order to account for the links between the distribution of micro-organisms and the distribution of their activities in their micro-habitats, the methods previously developed can be used in combination.

The localization of microorganisms is often linked to the visualization of activities in soils through the use of FISH labellings and micro-autoradiography FISH (MAR-FISH) (Lee et al., 1999; Ouverney and Fuhrman, 1999; Torsvik and Øvreås, 2002; Nubel et al., 2002; Musat et al., 2012) or the combination of fluorescence microscopy, electron microscopy, computed tomography and nanoSIMS (Schlüter et al., 2019). Similarly, the use of FISH followed by the use of nanoSIMS (FISH-SIMS) allows for the analysis of the activities of defined microorganisms (Musat et al., 2012; Mueller et al., 2013; Schurig et al., 2015). The FISH methods used can be adapted using very electronegative halogen markers (I, Br) (HISH-SIMS) which can be detected in SIMS directly (Li et al., 2008; Musat et al., 2012; Mueller et al., 2013) while, to our knowledge, this technique has not been applied yet to soil samples. Finally, the cross-use of SIMS with electron microscopy is frequent or even necessary. It facilitates the prior identification of areas of interest and makes it possible to obtain information related to micro-habitat (Mueller et al., 2013).

These methods are not trivial and necessitate to have a precise idea of what to observe. It is often complicated to match zones at such fine scales. NanoSIMS for example needs to know where to observe at the µm scale to make in the first place images of the zone with electron microscopy and then, the process to find back the zone with NanoSims can still be complicated. In addition, matching images which allow visualizations in some depth with ones which allow only surface visualization can be challenging because images will be very different and make it difficult to recognize objects. Of course, if the interested zone is not specifically on the surface although visible by light microscopy, then, it will not be possible to reach it with surface techniques as such as electron microscopy or NanoSIMS (except if the object is very close to the surface where you can expect to reach it by an abrasion of surface). That’s why combination of such techniques needs clear and realistic objectives, focusing on zones where there is a certainty to find the targeted objects and previous preparation with images and precise landmarks.

5.4. Characteristics of the microorganisms’ microhabitat

5.4.1. Physical characteristics of the habitat

Soil structure has many impacts on soil local or global functioning, for example in terms of transport of resources (oxygen, water, organic matter) and of microorganisms. This is why

characterizing this structure is essential when studying soil micro-habitats.

The most frequently used method to describe the 3D structure of a soil is now X-ray computed tomography (X-R CT) or X-ray micro computed tomography (µ X-R CT) (Fig. 44). It has been used as well to study soil micromorphology (Elyeznasni et al., 2012), the heterogeneity of soil chemical composition (Hapca et al., 2015) and to study the microbial environment (Juarez, 2013; Helliwell et al., 2014; Schlüter et al., 2019).

The variation in absorption of the X-rays by different materials makes it possible to obtain images, in gray levels, that reveal the different phases of the soil (solid vs porosity). After segmentation their 3D distribution is determined in a non-destructive way and with a resolution which can be less than a micrometer, but most frequently of a few micrometers (Landis and Keane, 2010) (Table 6).

Other methods such as light and transmission electron microscopy may also be used to describe the structure of a soil, but these methods provide much less complete information since they are in two dimensions even if 3D acquisitions can be done on small samples using FIB-SEM (e.g., Vidal et al. (2018)). However, depending on the information sought, they can be adapted in cases where it is desired to obtain better resolutions, for example (Table 6).

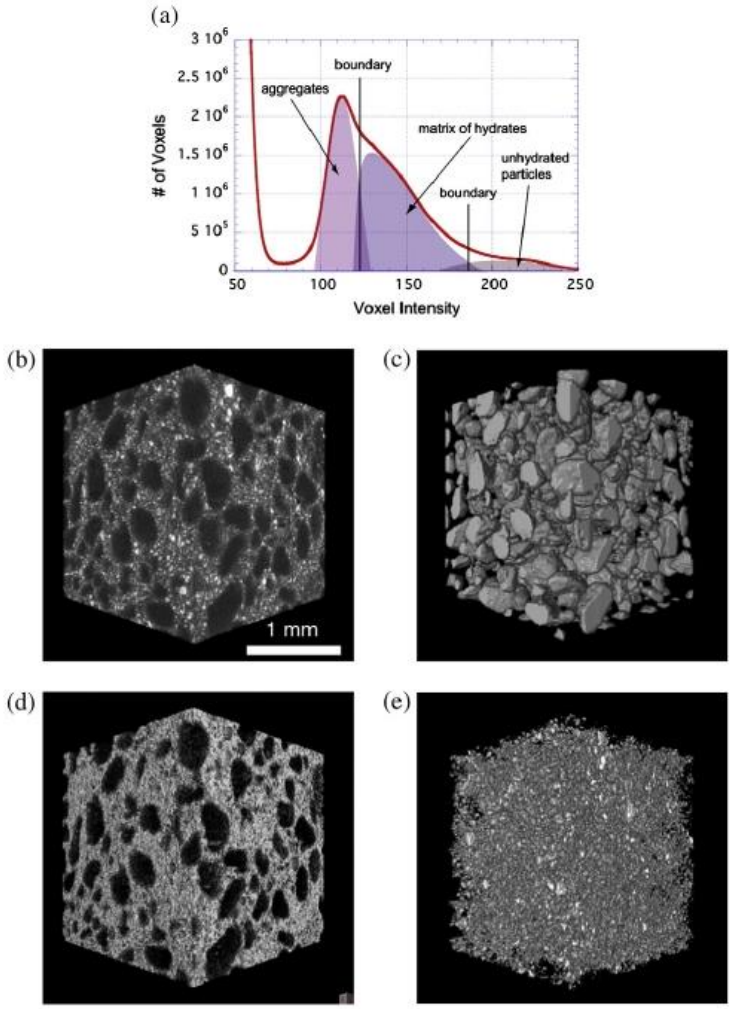


Figure 44 - Images obtained by X-ray tomography of a cement material (b) in which are segmented 3 solid phases: aggregates (c), cement hydrates (d) and un-hydrated particles (e) through the histogram of the image (a), the thresholds or boundaries of which are placed at the weakest points of the phase overlap. Images modified from Landis and Keane, (2010)

5.4.2. Localisation of organic matter in soil

The visualization of soil organic matter (SOM) is an essential condition for their morphological characterization as well as their location within the other constituents of the soil. A better understanding of soil organic matter dynamics requires the acquisition of this type of information given the importance of accessibility of SOM to microorganisms and this can be done in different ways depending on the raised issues.

Table 6 - Imagery methods to characterise soil's habitats

Methods	Resolution	Visualisation criterion	Sample size	Dimension	References
Light microscopy	mm – 200 nm	Size, shape, contrast of solid particles (+staining or labelling of organic matter)	cm	2D or 3D (confocal)	Schlüter et al. (2019)
SEM	100 µm – 1 nm	Size, shape, topography of solid particles	mm – cm	Surface 3D	Chenu and Jaunet (1992); Chenu and Tessier (1995); Lin and Cerato (2014)
TEM	100 µm – 0,05 nm	Size, shape, contrast of solid particles (+staining or labelling of organic matter and microorganisms)	mm – cm	2D	Foster, (1988); Chenu and Plante (2006)
S/TEM + EDX	100 µm – 0,05 nm	Same as TEM + Elementary mapping of soil particles	mm - cm	2D	Watteau et al. (2012); Hapca et al. (2015)
TEM + EELS	100 µm – 0,05 nm	Same as TEM + Elementary and chemical bonds mapping	mm – cm	2D	Watteau et al. (1996, 2002)
AFM	10 – 20 nm	Topography, resistance of the surface of the sample	mm	Surface 3D	McMaster (2012)
STXM	30 – 50 nm	Elementary mapping of solid particles	-	2D	Kinyangi et al. (2006); Lehmann et al. (2008); Remusat et al. (2012)
XANES STXM + NEXAFS	30 – 50 nm	Functional groups mapping including of organic matter	-	2D	Kinyangi et al. (2006); Lehmann et al. (2008); Remusat et al. (2012)
FTIR spectro-microscopy	< µm	Functional groups mapping including of organic matter	-	2D	-
NanoSIMS	< 100 nm	Elementary and isotopic mapping (+ isotopic labelling) of solid particles	10 – 20 mm	2D	Mueller et al. (2012); Remusat et al. (2012)
(µ) X-R CT	µm	Size, shape, contrast of solid particles and size and shape of soil pores (+staining or labelling of organic compounds)	-	3D	Peth et al. (2008, 2014); Elyeznasni et al. (2012); Juarez et al. (2013); Juyal et al. (2018); Schlüter et al. (2019)

The observation of organic matter can be done by microscopy, at different resolutions. First of all, optical microscopy allows visualization of OM in soil thin sections on the basis of shape and color. Even if it would be possible to visualize them after staining in epi-fluorescence microscopy, this is not or little used at present because of the auto-fluorescence problems of the mineral phase of the soils (Chenu et al., 2015).

With electron microscopy, SOM is also identified with criteria of shape in the case of SEM and TEM, and of electron density in the case of TEM. It is also possible to stain SOM using

heavy metals in order to amplify the contrast with the rest of the matrix (Foster, 1988; Elsass et al., 2008; Mizutani and Suzuki, 2012; Chenu et al., 2015) (Fig. 45).

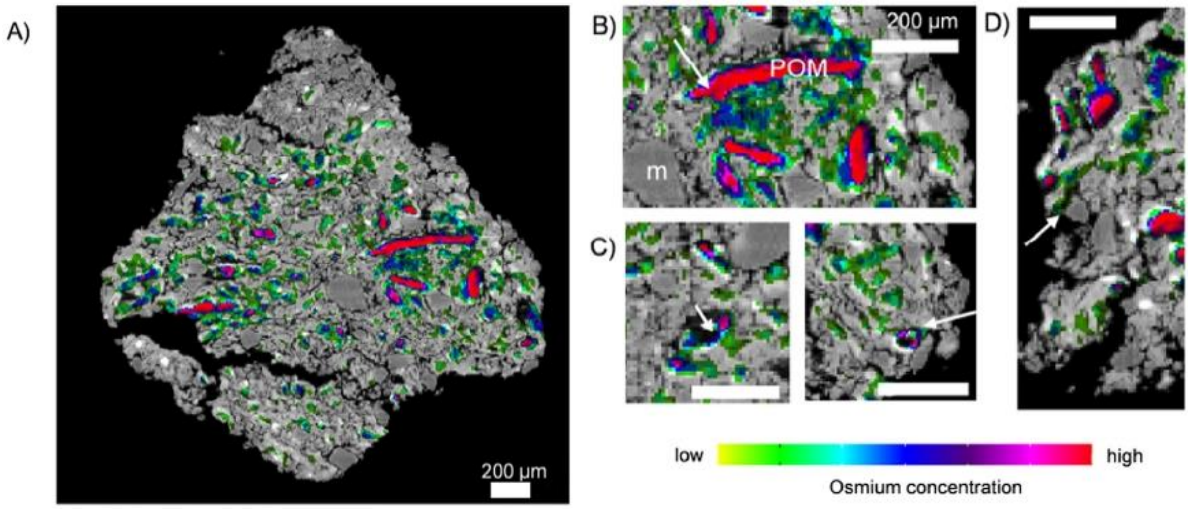


Figure 45 - Spatial distribution of stained OM with osmium inside a section of aggregate (A). Particulate OM (POM) show the osmium strong staining in red (B) and the less important ones in green or yellow at the pore surface (C) or following cracks (D). Images: Peth et al. (2014).

The use of electron microscopy coupled with energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX), enabled by the genesis of X photons following the meeting of electrons with atoms, is used to determine the elementary composition of the OM (Table 6) (Chenu and Plante, 2006; Hapca et al., 2015; Chenu et al., 2015). Similarly, the association with electron energy loss spectroscopy (EELS) brings information on the elementary composition and the chemical bonds of OM (Watteau et al., 1996, 2002).

Scanning transmission X-ray microscopy (STXM) provides, like TEM, an image of a thin object by transmission, but in this case from X-rays. The absorption of X-rays at different levels of energy allows mapping the distribution of the elements (Table 6). The samples must be very thin, but the method has the advantage of accepting hydrated materials if very thin (Chenu et al., 2015).

Information on functional groups can be obtained by X-ray absorption near edge structure (XANES) by coupling the STXM with Near-edge X-ray fine structure spectroscopy (NEXAFS) (Remusat et al., 2012) at nanometric resolution (Table 6) (Fig. 46). This method was used by Lehmann et al. (2005) to perform a nanometric mapping of the distribution of different forms of organic carbon in soil particles. The resins used to make the inclusions

necessary for the creation of thin sections must be distinguishable from the mapped elements. Thus, the resins used for the distribution images of carbon or organic matter in soil must be carbon-free or differentiable. Inclusions can be performed with polymerized elemental sulfur (Lehmann et al., 2005), but some studies also use frozen samples (Lehmann et al., 2008; Solomon et al., 2012).

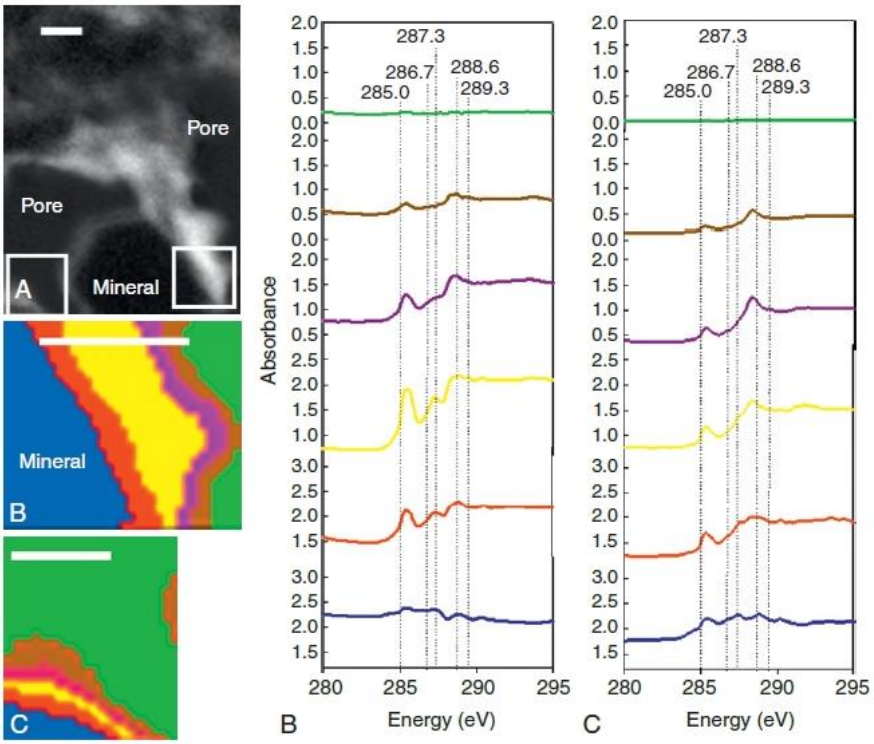


Figure 46 - Observations of organic carbon from a kaolin oxisoil by NEXAFS (resolution = 50nm). (A) Optical density map of total carbon: light zones indicate the presence of carbon; white squares indicate interest zones on which the NEXAFS map had been done (B) and (C). Scale bars: 1 µm. Images: Singh and Gräfe (2010) from Kinyangi et al. (2006)

Fourier transform infrared micro-spectroscopy (micro-FTIR) also makes it possible to characterize, quantify and locate organic molecules thanks to the bonds of their functional groups (Singh and Gräfe, 2010). However, the resolution is generally lower (Table 6).

Several infrared spectro-microscopy methods using different wavelengths such as the very near infrared (VNIR) enabled, using predictive models, to obtain images up to 53 µm resolution on dried soil, with detailed estimations of the organic carbon spatial distribution in a soil as a function of depth (Fig. 47) (Steffens and Buddenbaum, 2013; Hobley et al., 2018). One of the advantages of this method is that it requires almost no prior preparation except

having a dry sample. In addition, many studies use near and medium infrared methods because they provide a large amount of information (Reeves, 2010; Steffens and Buddenbaum, 2013).

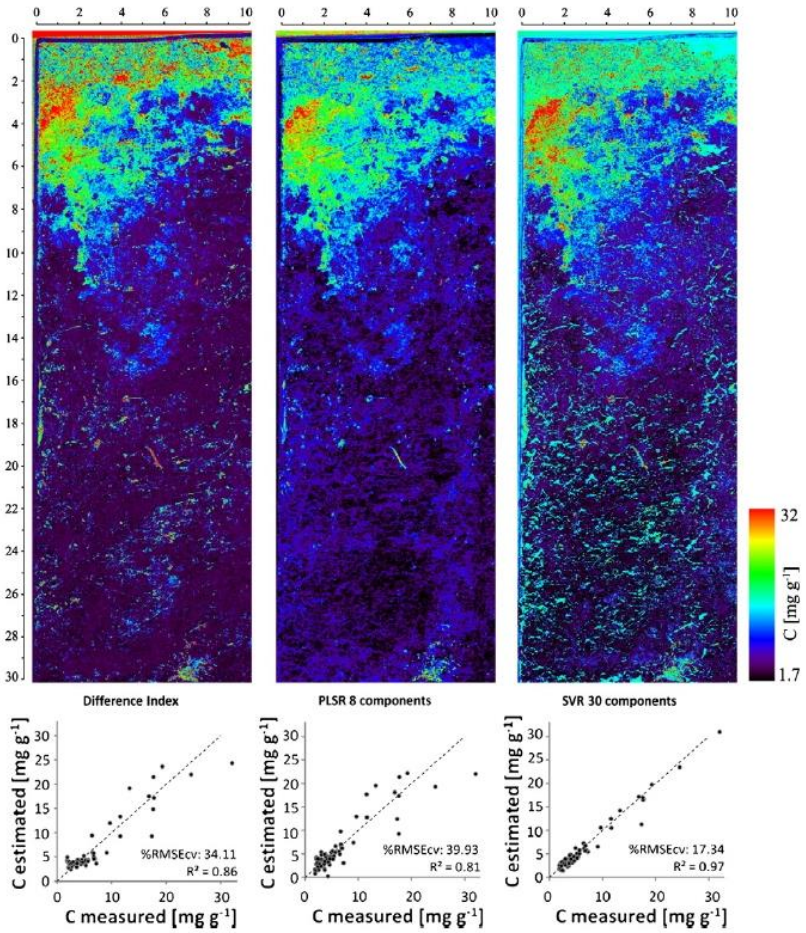


Figure 47 - Carbon concentration forecast and their repartition in a soil observed with hyperspectral VNIR camera and 3 linear regression models (narrow band index, partial least square regression (PLSR) and support vector regression (SVR)) – Dimension are in cm. Images: Steffens and Buddenbaum, (2013).

Other micro-spectroscopy methods are still little used in soil science, such as Raman spectrometry which allows molecular analyses (Musat et al., 2012) or Matrix assisted laser desorption ionisation (MALDI) which makes it possible to map analytes as it has already been done by Rudolph-Mohr et al. (2015) on roots after their extraction from the soil.

Spectro-microscopy used with synchrotron radiation, brighter and above all better focused, gives a more precise information than that obtained by spectroscopy used with conventional radiations (Singh and Gräfe, 2010). It also brings information on the location and nature of the OM contained in a sample at finer scales than with conventional radiations. These

methods are, for the most part, non-destructive and with high resolutions, which makes it possible to obtain information of various natures on the OM of a sample at the scale of microbial habitat (Singh and Gräfe, 2010).
NanoSIMS, described in paragraph 2.2., also allows elementary maps of samples to be carried out at nanometric resolution (Remusat et al., 2012; Schurig et al., 2015). Resins containing carbon can be used if it is possible to separate them from the bottom by their particular signal. Araldite is therefore frequently used to include soil samples (Mueller et al., 2012; Vidal et al., 2018).

There are few methods which allow visualizing organic matter in the three dimensions of space. With CT, samples are subjected to an X-ray beam from different angles allowing a 3D reconstruction of the object with transmitted rays providing an image of the density of the sample. As with transmission microscopy, SOM can be observed according to density criteria for larger objects (Chenu et al., 2015) but this remains difficult given the lack of contrast between SOM and other soil constituents (Roose et al., 2016). Methods have been developed to stain organic matter with heavy elements in order to accentuate this contrast (Mizutani and Suzuki, 2012; Peth et al., 2014; Van Loo et al., 2014).
In micro-spectroscopy, µX-ray fluorescence (µXRF) tomography is a promising method which provides information on the chemistry of 3D samples but its use is very rare in particular because of the improvements which still have to be made to circumvent the problems of fluorescence attenuation in soils (Hapca et al., 2015; Roose et al., 2016).
It may be interesting to note that it is possible to consider using some of the methods seen above and to carry out 3D reconstructions by using a statistical approach. A study made by Hapca et al. (2015) carried out several elementary 2D maps of a soil in SEM-EDX and was able to combine them with other 3D images from X-ray tomography and extrapolate the chemical characteristics (Fig. 48).

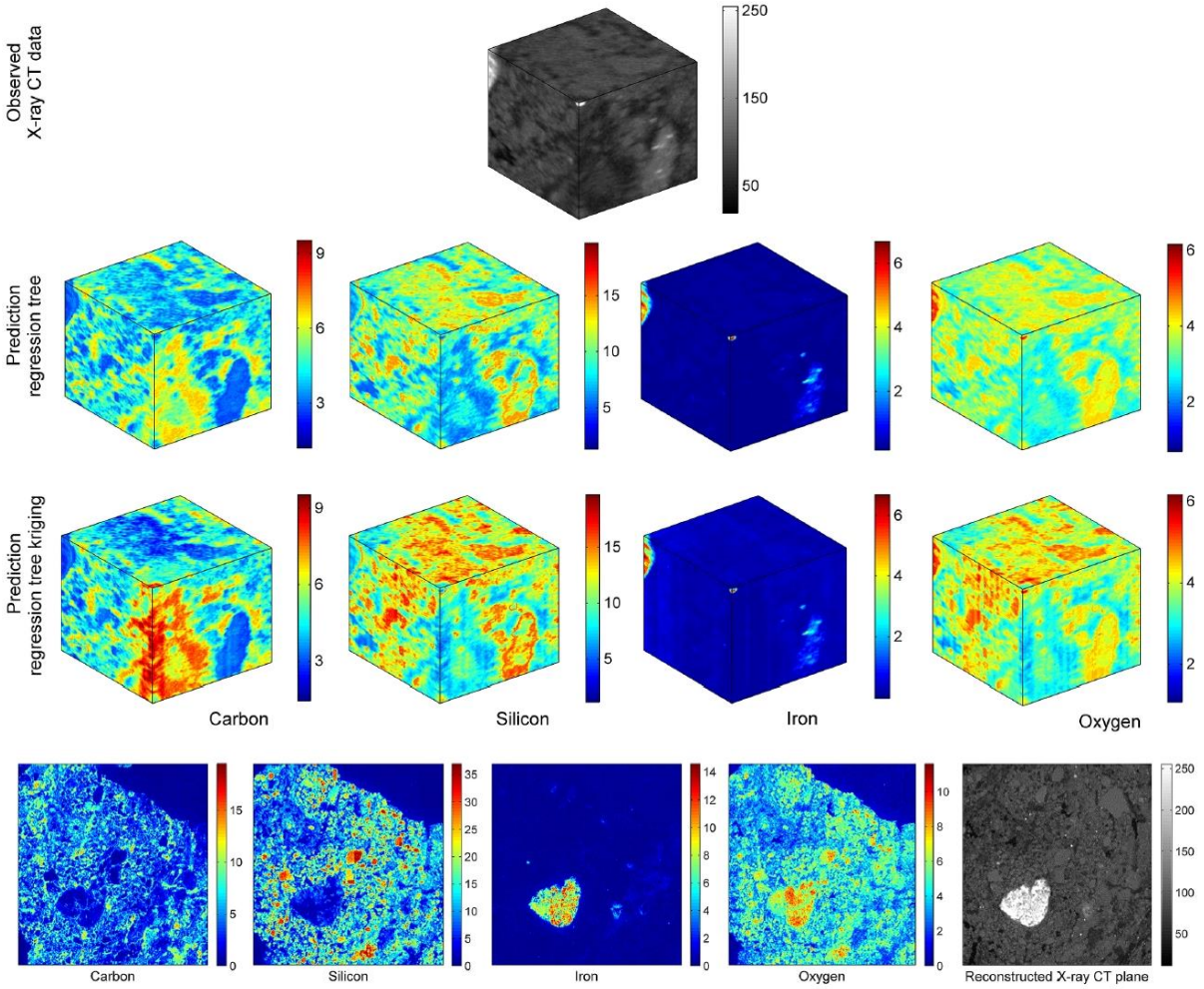


Figure 48 - Chemical map done with SEM-EDX (a) combined with X-R CT allowing getting a 3D reconstruction of soil chemical composition using a statistical approach with a regression tree and a krigeage regression tree (b). Each cube measure approximatively 1 x 1 x 1.3 cm. Images from: Hapca et al. (2015)

5.4.3. Other chemical characteristics of the habitats

5.4.3.1. Oxygen and carbon distribution in soil

As dynamics of soil oxygen and carbon dioxide are associated with respiration and therefore reflect the activity of the organisms (Kuzyakov and Blagodatskaya, 2015), they are often monitored quantitatively in the ambient air around the soil sample but little studies question the distribution of these gases directly inside soils, at the scale of the microbial habitat.

Methods are being developed to visualize the distribution of partial gas pressures in soils

using probes. They can be of different nature but generally involve a combination of gels and optical sensors (Pedersen et al., 2015). These probes, allowing visualizing the distribution of partial gas pressures, are called planar optodes. Their principle is based on the use of fluorescent materials, sensitive to the presence of a gas which will act as exciter or extinguisher of fluorescence causing variations in brightness recorded by a camera (Rudolph et al., 2012; Pedersen et al., 2015). The use of these fluorescent chemical probes has the advantage of being very sensitive and reversible (Rudolph et al., 2012). This type of observation offers resolutions that vary depending on the cameras used and the experimental device, but a maximum resolution of the order of a few tens of micrometers has already been reached (Larsen et al., 2011; Pedersen et al., 2015).

Most of these probes allow the visualization of several types of analytes like the one used by Borisov et al. (2011) allowing the simultaneous monitoring of oxygen, carbon dioxide, pH and temperature. However, this type of techniques still requires some improvement. Indeed, the addition of analyses leads to interference which can bring different results depending on the number of additions (Borisov et al., 2011; Pedersen et al., 2015). In 2012, a study by Rudolph et al. (2012) succeeded in visualising the oxygen dynamics in a rhizosphere in a non-invasive way and a study by Rudolph-Mohr et al. (2015) used this method to describe the dynamics of oxygen distribution in a soil treated with pesticides (Fig. 49).

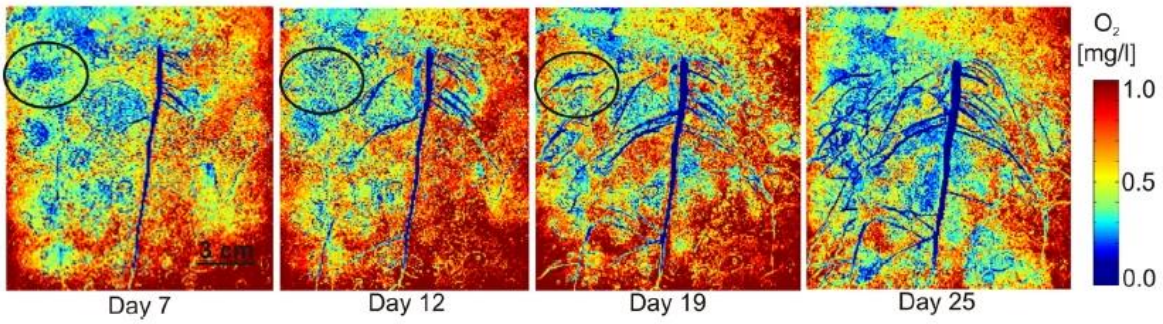


Figure 49 - Images taken over time with the use a chemical probe of the evolution of O2 induced by the respiration of lupine roots. Images from Rudolph et al. (2012)

5.4.3.2. Water distribution in soil

The availability of water within soil porosity is a major factor driving microbial activity. Several methods have hence been tested in their ability to visualizing water in soils.

At the rhizophere scale, an existing but little used method for visualizing water dynamics is magnetic resonance imaging (MRI) (Pohlmeier et al., 2008; Roose et al., 2016). This method has the advantage of offering 3D images, which few other methods currently offer. Neutron radiography which analyzes neutrons transmitted through a sample also gives access to this type of information, but in two dimensions only (Carminati et al., 2010; Rudolph et al., 2012) (Fig. 50).

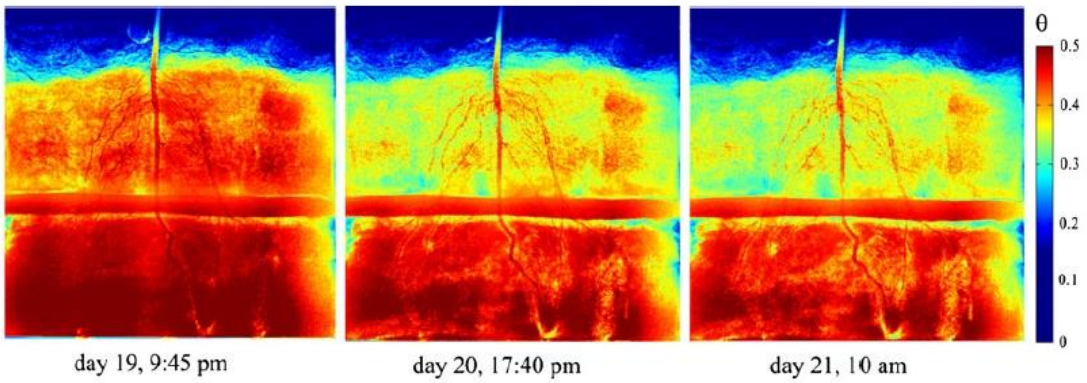


Figure 50 - Images realised with neutron radiography showing the distribution of water in a soil containing a layer of sand and inside it is possible to see lupine roots. Each image measures 10 x 10 cm approximatively. Images from: Rudolph et al. (2012).

Finally, neutron computed tomography is also a method where neutrons are absorbed by the sample but providing three-dimensional images in the same way as X-R CT could do (Koliji et al., 2010). This method has been used by Carminati et al. (2007) to study water flows in soil.

The resolution can currently explain the seldom use of these methods for studies on microbial habitats. This is why articles utilizing them rather deal with the scale of the rhizosphere. Finally, X-ray CT, delivering images in gray levels that are characteristic of the different phases of soil can also bring in information on the spatial distribution of water. A segmentation treatment makes it possible to distinguish water from soil, in 3D, non-destructive way and with a resolution which may be less than a micrometer (Landis and Keane, 2010). In the same way as the mapping of organic matter, some studies have attempted to use contrast agents in order to bring out the water signal from the soil (Van Loo et al., 2014). Others have attempted to combine images of a dry and wet soil to subtract the "dry soil" signal from the "wet soil" signal in order to isolate the "water" signal (Tracy et al., 2015). However, this approach does not seem suitable for all types of soil, given the risk of

shrinking and swelling of the soil following significant variations in humidity (Baveye et al., 2018).

5.4.3.3. Other chemical characteristics of the soil

Planar optodes, described in section 5.4.3.1., also allow the visualization of other molecules such as NH_4^+ or PO_4^{3-} (Pedersen et al., 2015). They also allow mapping different potentials such as hydrogen potential (pH) or redox potential (eH) (Pedersen et al., 2015; Roose et al., 2016). Reagents sensitive to acid-base variations and to pH have for example been used by Rudolph-Mohr et al. (2015) to describe their variations within a soil under the application of pesticides.

Table 7 - Other methods to characterise chemical characteristics of soil

Characteristics	Methods	Resolution	Visualisation criterions	Samples sizes	Dimension	References
Oxygen repartition	**Planar optode**	< 100 µm	Brightness variation	-	2D	Rudolph et al. (2012); Rudolph-Mohr et al. (2015)
Water repartition	**Magnetic resonance imaging (MRI)**	> 30 µm	Contrasts	-	3D	Pohlmeier et al. (2008)
	Neutron CT	-	Contrasts	-	3D	Carminati et al. (2007)
	Neutron radiography	200 µm	Contrasts, density	cm	2D	Carminati et al. (2010); Rudolph et al. (2012)
pH	**Planar optode**	< 100 µm	Brightness variation	-	2D	Rudolph-Mohr et al. (2015)

5.5. Discussion

Observation methods developed above all present different advantages and disadvantages and the choice of one rather than another one will depend on the scientific question to be answered. Observations as a whole can only be relevant if they are properly suited to the objectives of the study. Among the precautions to be taken, one must ask the question of the

preparation of the samples before any observation, but also that of the quality and treatment of the images obtained following an observation and finally of the representativeness of these images in regard to the scientific question.

5.5.1. Samples preparation methods

A first constraint related to the choice of method can be related to the sample preparation steps. Observation methods require fairly often the production of thin sections (Nunan et al., 2001; Jacobson et al., 2007; Gutiérrez Castorena et al., 2016) and/or an impregnation step (Herrmann et al., 2007a; Jacobson et al., 2007; Mueller et al., 2012). The procedure used must be adapted to the sample and the objective of the study taking in consideration the issue of the preservation of the studied compounds and of their organization.

5.5.1.1. Fixation and dehydratation

A fixation step is necessary for any observation of living organisms (plants or microorganisms) that require dehydration, allowing objects to be kept in their original state. These fixation steps are often realised with toxic compounds which therefore implies taking precautions in terms of user safety. Glutaraldehyde solutions are frequently used for this purpose (Tippkötter et al., 1986; Altemüller and Van Vliet-Lanoe, 1990; Nunan et al., 2001; Vidal et al., 2018).

Another point is that the study of soil porosity requires that soil structure should not be altered. However dehydration, which is essential for the functioning of some methods (TEM, SEM, NanoSIMS…) and the hardening of the resin when used, can have an impact and alter the organization of the soil porosity (Tippkötter and Ritz, 1996). The drying steps can lead to shrinkage or swelling of the soil and different protocols exist such as air drying samples (Gutiérrez Castorena et al., 2016), freeze-drying (Tippkötter et al., 1986) or dehydration with water-ethanol or water-acetone gradients (Tippkötter et al., 1986; Nunan et al., 2001; Elsass et al., 2008; Mueller et al., 2012). Water-acetone exchanges have proven their efficiency in limiting these impacts and allow overcoming these difficulties (Altemüller and Van Vliet-Lanoe, 1990), provided for organic and biological constituents observed at the nm to µm scale

a chemical fixation is performed before (Elsass et al. 2007). Supercritical drying also proved its efficiency to dry soil containing naturel “gels” (allophanic soils) (Woignier et al., 2005, 2008; Calvelo Pereira et al., 2019).

5.5.1.2. Stains

Stains (fluorochromes or contrast agents) used in particular with epi-fluorescence or confocal microscopy, for observations of microorganisms may have limited efficiency. Any type of stain, and particularly in undisturbed soil, may have difficulty penetrating the sample and thus the efficiency of the staining would not be optimal (Peth et al., 2014). In addition, stains can also target molecules which are not those sought and cause non-specific staining with effects depending on soil characteristics. Also, controls should be considered if possible with unstained thin sections or samples to assess the part of auto-fluorescence from soil in fluorescence microscopy. In some cases, especially when stains cannot withstand the steps of realization of thin sections like with acridine orange (Altemüller and Van Vliet-Lanoe, 1990; Postma and Altemüller, 1990), markers can be applied on the surface of previously prepared thin sections (Gutiérrez Castorena et al., 2016).

5.5.1.3. Embedding steps

Embedding has to be performed in the right way, as it is not always easy to make sure that the resins well penetrate porosity and do not produce bubbles considering their high viscosity. This is specifically true with big samples which require long time in high vacuum conditions to avoid the porosity to be unfilled which lead to fragile samples for the following process (cuts, polishing). Some studies perform multiple additions of resins at different dilutions with acetone making it less viscous and allowing a better filling of the porosity (Nunan et al., 2001; Mueller et al., 2012; Vidal et al., 2018).

In addition, the choice of the resin for the embedding steps needs also be clearly considered according to the methods used and the study objectives. For example, nanoSIMS requires the use of a special resin such as Aradite-502 (Mueller et al., 2012; Vidal et al., 2018) which must

be able to resist the applied pressures in nanoSIMS (Herrmann et al., 2007a; Mueller et al., 2012). Similarly, any study targeting the localization and characterization of soil carbon in soil requires the use of specific resin to avoid contamination (Mueller et al., 2012; Vidal et al., 2018). For the specific case of nanoSIMS, we can add that if most of samples are embedded, direct deposition of samples is also possible as soon as they are very flat (< 1µm topography for natural abundance and 30µm for stable isotopes enriched samples) (Mueller et al., 2013).

5.5.2. Image processing

Another difficulty related to these visualization techniques concerns image processing. First, the images obtained have characteristics which differ according to the modes of acquisition (size and depth fields, resolutions, number of channels, bit depth) which imply different strategy of image processing and analyses. Starting from the raw image, identification of different soil constituents can require a significant expertise which has to be used in order to choose the right way to process images. Indeed, observation methods based on shapes and colours for example can generate errors and also lead to different conclusions from an observer to another one (Baveye et al., 2010). Replications of observations at different dates and several observers can be involved, but it is time consuming (Kleber et al., 2003; Chenu and Plante, 2006). Further, 2D identifications to visualize cross-sectional objects may be complex (fungi for example).

Stains used can provide more contrasting results and make it easier to identify the different soil constituents. Nevertheless, they still have their limits. In cases of non-specific or too weak stainings then it may be poorly detected or even misleading.

When acquiring images, it is important to note that very often the operator will have an impact on the quality of the final image. Indeed, the parameters to be set for any use of imagery are also very important and should be taken into account. We can assume that choices are done in order to get adapted parameters, but the different steps and protocol have to be cautiously recorded otherwise choices from one operator to another and from a day to another may not be the same.

Image processing often require segmentation, correction, filtration, etc. steps (Roose et al., 2016; Baveye et al., 2018). To avoid operator effects, image analyses should be automated as

much as possible. The choice of a segmentation threshold may be subject to the opinion of the observer and most studies recommend the use of a fully automatic thresholding. However, they must be chosen correctly according to the type of sample and the observed object (Iassonov et al., 2009; Hapca et al., 2013). The same is true for all stages of image processing (Kaestner et al., 2008; Houston et al., 2013) and these should always be carefully described in any scientific publication.

5.5.3. Image representativeness

Finally, as representativeness of images is linked to their size, for techniques allowing very high resolutions but lower sizes, the question of the representativeness of the images arises. The study areas must be chosen with care and if they are misused this approach can lead to focusing on exceptional areas and leading to wrong conclusions and hence it may become difficult to link observation results to the overall functioning of the soil. In this case, it is necessary to multiply the number of observations, but these technical solutions can be hindered by problems of time and costs of acquisition.

5.5.4. Combination of observation methods

5.5.4.1. Compatibility of the different methods

There is no single method to study both the spatial and temporal evolution of soil microorganisms and their activities and the description of microbial habitats. This is why understanding the functioning of the soil as a whole requires a combination of different methods. The first step is to check that the methods are compatible. When the analyses can be carried out on the same samples, then the question of the order of the methods to be used must be considered. Otherwise, the methods can be applied to different samples prepared under the same conditions, but the number of samples to be prepared can quickly become large.

Indeed, the methods previously described may require specific preparations or can be more or less destructive, such as SEM or SIMS, which require samples to be covered with a gold layer

and which operate by an electron/ion beam leading to a progressive abrasion of the study surface in the case of SIMS. These methods should therefore, if possible, be implemented in the final stages of observation. Other methods such as tomography or zymography are advantageous since, not requiring specific prior soil preparation, they allow multiple observations of the same object without such concerns.

Altogether, it is necessary to favour first the methods which do not require any particular preparation (X-ray or neutron tomography for example), secondly the observations using flat probes or gels (zymography or planar optodes) and requiring only a cut in the material, then the methods requiring the preparation of thin sections (light, epi-fluorescence, confocal microscopy) and finally all the methods whose operation consists in bombarding the surface of the object and which can irreversibly more or less damage the surface of the observed object (SEM, nanoSIMS).

5.5.4.2. Upscaling issues

In order to reach resolutions allowing access to the hidden information at the micro-scale in soils, certain methods have a very restricted field of observation compared to the global functioning of the soil and these observations lead to the question of the upscaling. How can we account for these observations on larger scales? Are they representative of the phenomena described on a larger scale? Some studies recommend the creation of mosaics of high resolution images in order to obtain a wide image of the samples. Others advice to work with an average volume which consists of averaging microscopic description into a Representative Elementary Volume (Baveye et al., 2018) or a homogenisation which assume that structure is sufficiently periodic to be considered as composed of repeated units for variables as porous structure (Roose et al., 2016). The use of these options are still under discussion considering the trade-off between the possibilities offered by such methods and the considerable loss of data that they can involve (Baveye et al., 2018).

The combination of observation methods could also contribute to solving this problem. It is for example possible to observe the enzymatic activity of a soil section at the centimetre scale thanks to zymography, then to complete information on microbial activities with observations of total (fluorescence microscopy) and active (nanoSIMS) microorganisms at the microscale. Such studies have already been carried out, such as that of Schlüter et al. (2019), who

combined X-ray tomography on a centimetre scale, optical microscopy and fluorescence on a millimetre scale, then electron microscopy on the scale of a few hundred microns and finally nanoSIMS on the tens of microns scale in order to describe the micro-habitat in a decaying leaf detritusphere combining structural, geochemical and biological data. They showed that if bacteria were mainly present in pores < 10 µm, their foraging preferences were to forage near macropores and organic matter. Juyal et al. (2019) also combined observations at millimetre (X-ray tomography, light and fluorescence microscopy) and micrometric (light and fluorescence microscopy) scales to study the localisation of microorganisms in the soil structure and in particular as a function of porosity indicators. These approaches make it possible also to combine 2D (SEM-EDX) and 3D (X-R CT) approaches and perform reconstruction methods such as that proposed by Hapca et al. (2015), based on a statistical approach to build new images giving chemical map of 3D soil sample. The development of computer calculation capacity also allows thinking that doing reconstruction from 2D to 3D images for certain data may be facilitated in the future. Still, this kind of work is not done easily and need improvements to make a link between images from different scales and moreover to investigate 3D representation from 2D approaches.

5.5.5. Perspectives

5.5.5.1. Methodological developments

Some methods are currently very little or even not used in soil sciences for different reasons. The µX-ray fluorescence CT for example which allows 3D reconstruction of the elementary distribution on a micrometric scale, is currently very little used because of developments and improvements which should be brought there in particular concerning the phenomena of attenuation of energy (Bleuet et al., 2010; Hapca et al., 2015; Roose et al., 2016). Nuclear magnetic resonance (NMR) often presented as Magnetic resonance imaging (MRI) may also raise problems when used with soil samples that contain paramagnetic particles as these can affect the operation of the magnets (Schmidt et al., 1997; Baveye et al., 2018). Methods such as Neutron radiography or Positron emission tomography (PET) scanning do not yet have suitable resolutions for the study of soils at the scale of microorganisms. A number of methods therefore still have technical limitations for applying them to the soil environment

and to the microorganisms spatial scales at this time. Other methods, however, are underused. Super-resolution methods allowing reaching unprecedented resolutions in optical microscopy would make it possible to visualize fluorescent source much better and to distinguish close objects that were identified as a single one by increasing the resolution by a factor of nearly ten times and hence allowing to study at very fine scale interaction between microorganisms and soil particles for example. Similarly, the methods of FIB, BIB or SBF are currently very little used when they could provide a lot of information in 3D of many objects not accessible by the resolutions offered by tomography or other methods with 3D renderings.

5.5.5.2. Dynamic observations

Few studies exist in the literature on temporal dynamics, while there is a need for knowledge, for example, on the evolution over time of the location of microorganisms in the soil after the application of an organic substrate or on the impact of microbial activities on soil structure. The first reason is that methods allowing visualization of soil microorganisms in their micro-habitat are time consuming and expensive. Further, if the visualization methods are destructive, this means being able to prepare and process a large number of replicate samples. Methods such as X-ray tomography, neutron radiography, or zymography allow repeated observations on the same sample at different dates. However, the methods currently adapted to this type of observations also sometimes remain difficult to implement since the scanning time of the sample must also be taken into account. For example, direct monitoring of water flow through the porosity remains difficult to study because tomography cannot currently scan fast enough to follow the speed of water flow in such porous material (Baveye et al., 2018).

5.5.5.3. Habitat characteristics and microorganisms activity are precious experimental data for modelling

It is necessary at present to establish laws of action between characteristics of the soil habitat (e.g. pore size distribution, distance to desaturated pores, etc.) and the activity of

microorganisms. Results obtained with visualization methods should make it possible to establish relationships between characteristics of soil habitats such as the pore size distribution and connectivity, the distance of microorganisms to pores, the nutrients spatial distribution and the activity of microorganisms. These data could be used as input to models for predicting the fate of C and N at the soil profile or plot scale.

The parameters influencing soil micro-habitats are still not fully understood and cannot currently be deduced from the characteristics measured in soils by macroscopic observations or analyses. The complexity of soils does not make it possible to establish simple links between macroscopic characterization tools and the dynamics of organic matter, the abundance and structure of microbial communities as well as their activity in a soil (e.g. Baveye et al. (2018)).

The consequences of microscale interactions cannot be studied only through bulk measurements, which does not give a good representation of spatial heterogeneities partly responsible of microorganisms abundance and activity in soil (Vos et al., 2013).

The localisation of microorganisms and organic matter in the physical structure of soil is a major issue in understanding the activity of microorganisms and soil greenhouse gas emissions. Indeed, a new generation of models is emerging whose objective is to give a more explicit description of soil structure and water distribution (Pot et al., 2015; Kemgue et al., 2019) and its complexity at the micro-scale in order to more accurately forecast the fate of organic matter in soil under a wide range of climatic and management conditions (Monga et al., 2008; Portell et al., 2018). The development and improvement of such models requires progressive adjustments through experimental micro-scale data allowing better understanding and describing this complexity and also its impact on the dynamics of soil processes. This experimental knowledge must therefore lead to identifying and quantifying relevant input parameters for models, such as the distribution of microorganisms (Raynaud and Nunan, 2014) or organic matter (Peth et al., 2014).

5.6. Conclusion

Imaging techniques have developed significantly in recent years and have become increasingly accessible with time. Microscopy now allows to localizing and identifying microorganisms at finer scales with more accuracy and confidence and new techniques now

allow mapping selected microbial activities in the soil structure, such as enzyme activities and substrate assimilation. The improvement of existing techniques allows catching more precise details at better resolutions than it has ever been done before and the development of new technologies opens new horizons. However, technical development is still necessary and in particular to reduce analysis time and costs and to optimise the combination of different methods. The information obtained on the spatio-temporal evolution of microorganisms and their activities in soil structure should make it possible to improve the simulation models used to simulate the fate of substrates in soils and lead to a better understanding of soil functioning.

Chapitre 6: Evolution spatio-temporelle des microorganismes totaux et actifs à une échelle µm à mm dans la détritusphère

Chapter 6: Spatial and temporal evolution of total and actives microorganisms from µm to mm scale in detritusphere

6. Evolution spatio-temporelle des microorganismes totaux et actifs à une échelle µm à mm dans la détritusphère

6.1. Introduction

L'accessibilité microorganismes-substrat est l'un des principaux facteurs de la biodégradation (Pinheiro et al., 2015). Dans le sol, l'accessibilité est principalement contrôlée par l'espace poral qui se caractérise par la taille et l'interconnexion des pores venant moduler les transferts d'eau, de solutés et d'air et des microorganismes.
Bien que la minéralisation soit un phénomène global au regard du sol, il est nécessaire de mieux connaitre la distribution spatiale des microorganismes et des substrats dans le sol et leur évolution spatio-temporelle si l'on veut comprendre son fonctionnement, la structure du sol jouant un rôle plus important que celle des communautés microbiennes dans un environnement oligotrophe (Nunan et al., 2017).
Ce manque de connaissances est une des hypothèses expliquant la difficulté de simuler la dynamique du C par les modèles qui prennent en compte les caractéristiques globales des sols. Ainsi la prise en compte de la complexité et hétérogénéité du sol pourrait permettre d'améliorer les modèles de prédiction des émissions de carbone par les sols (Ebrahimi et Or, 2014; Portell et al., 2018).

Certains modèles, représentant de manière explicite la structure du sol à l'échelle de l'habitat des microorganismes, ont été développés ces dernières années mais les connaissances permettant de rendre compte de l'organisation du sol à ces échelles restent limitées. Si des méthodes comme la tomographie à rayons X permettent d'obtenir des informations sur la structure du sol à laquelle on peut intégrer des informations de remplissage de la porosité, il y a beaucoup moins d'informations sur la répartition spatiale des substrats et microorganismes, acteurs de la biodégradation, dans cette structure et encore moins sur leur évolution spatio-temporelle en fonction de différents types de sols, différents potentiels hydriques.

Les microorganismes n'occupent qu'une petite fraction estimée à 0,001% du volume du sol (Chenu et Stotzky, 2002; Grundmann, 2004) et sont principalement localisés dans des petits pores de diamètre compris entre 2.5 et 9 µm (Ranjard et Richaume, 2001; Frey, 2007). Les champignons, eux, sont principalement présents dans des pores de plus de 5 µm. Ils sont

plutôt observés à la surface des agrégats et peu présents dans les micro-agrégats (Strong et al., 2004; Frey, 2007).

Les observations de microorganismes à une échelle micrométrique ont pour objectif d'apporter des réponses sur la distribution spatiale des microorganismes totaux et actifs dans les agrégats et par rapport à la porosité. Ces informations sont déterminantes pour comprendre si le substrat doit plutôt diffuser dans la macroporosité ou dans la microporosité pour entrer en contact avec les microorganismes dégradants, ce qui dépendra de la saturation des pores et donc de la teneur en eau du sol.

Quelques travaux existent (Nunan et al., 2003) et ont permis de modéliser la distribution spatiale des microorganismes (Raynaud et Nunan, 2014). Ces résultats, qui représentent un travail énorme, n'ont cependant été acquis que sur un seul type de sol.
La distribution spatiale des microorganismes a aussi pu être étudiée en fonction de la porosité, la profondeur du sol ou encore selon leur distance à des débris végétaux (Gaillard et al., 1999; Nunan et al., 2003; Bruneau et al., 2005; Juyal et al., 2018, 2019; Schlüter et al., 2019). Ces travaux ont montré que les microorganismes ne sont répartis dans le sol, ni de manière uniforme, ni de façon aléatoire. Les colonies de microorganismes sont organisées sous forme de patchs (Grundmann et al., 2001), préférentiellement près de ressources nutritives (Foster, 1988; Ranjard et Richaume, 2001; Frey, 2007) et dans des zones à l'interface entre l'eau et l'air (Strong et al., 2004). Ainsi, l'observation de sols à micro-échelle a permis de mettre en évidence des gradients de répartition autour de matières organiques fraiches (Gaillard et al., 1999; Schlüter et al., 2019) ou par rapport à des macropores du sol (Nunan et al., 2003). Cependant, il n'existe pas à notre connaissance d'études à micro-échelle donnant des informations sur l'évolution spatio-temporelle des microorganismes totaux et actifs dans les sols, comme souligné par Baveye et al. (2018).
Le manque de connaissances à ces échelles est notamment causé par la difficulté d'obtenir des images à la fois suffisamment nombreuses et précises pour visualiser le sol à échelle microscopique tout en s'assurant d'une représentativité satisfaisante du sol. Remplir l'ensemble de ces conditions s'avère être un travail lourd et contraignant. Bien que la tâche reste difficile, l'amélioration des systèmes d'acquisition rend aujourd'hui ce genre de défis de plus en plus atteignable.

La teneur en eau peut moduler la diffusion des ressources organiques dans le sol et avoir un impact sur les communautés microbiennes et leur activité. Cependant, si l'on sait que l'état hydrique d'un sol affecte la biomasse microbienne et la structure des communautés microbiennes, nous ne connaissons pas de travaux concernant l'effet des conditions hydriques sur la distribution spatiale des microorganismes du sol à micro-échelle.
De manière générale il existe peu d'informations sur i) la distribution spatiale des microorganismes totaux et dégradants dans le sol, ii) leur évolution spatio-temporelle dans des hot-spots de biodégradation et iii) comment influent des facteurs comme la teneur en eau sur cette distribution à l'échelle de l'habitat microbien.

L'objectif de ce travail était donc d'étudier l'évolution spatio-temporelle à échelle micrométrique de la distribution des microorganismes totaux et actifs après apport localisé de résidus végétaux au sol ainsi que l'effet de la teneur en eau sur cette distribution. Pour ce faire, nous avons utilisé la microscopie à fluorescence afin de localiser les microrganismes totaux et la nanoSims pour localiser les microorganismes actifs marqués au ^{13}C.
Dans cet objectif, des cosmes de sol avec un apport localisé de résidus de culture, enrichis en ^{13}C, ont été préparés dans les mêmes conditions que celles décrites dans les chapitres précédents et incubés à différentes teneurs en eau afin de réaliser des lames minces permettant d'aboutir à ces observations. Nous avons cherché à répondre aux questions suivantes :

- Existe-t-il un gradient de distribution des microorganismes en fonction de leur distance aux résidus végétaux ?

- La distribution des microorganismes est-elle aléatoire ou organisée par rapport aux macropores inter-agrégats, qui sont désaturés dans les conditions expérimentales et représentent donc une voie privilégiée de transfert d'oxygène ?

- La distribution des microorganismes est-elle homogène ou agrégée ? La taille des colonies bactériennes dépend-t-elle des conditions hydriques et de la proximité de la ressource trophique que sont les résidus végétaux ?

6.2. Matériels et Méthodes

6.2.1. Préparation des cosmes

Les cosmes ont été préparés de la même manière que ceux décrits dans le chapitre 3 et ont été incubés dans les mêmes conditions (pF1,5 ; pF2,5 et pF3,5). Seul leur diamètre diffère, chaque cosme mesurant 20 mm de diamètre (interne) pour 40 mm de haut. Ainsi, les cosmes contiennent initialement 20,41 mg de résidus pour 16,33 g de sol sec, soit 0,52 mg $C_{(résidus)}.g^{-1}$ de sol sec. Aux dates 3, 7, 15 et 45 jours, trois cosmes par potentiel hydrique ont été sacrifiés pour la préparation de lames minces.

6.2.2. Préparation des lames minces

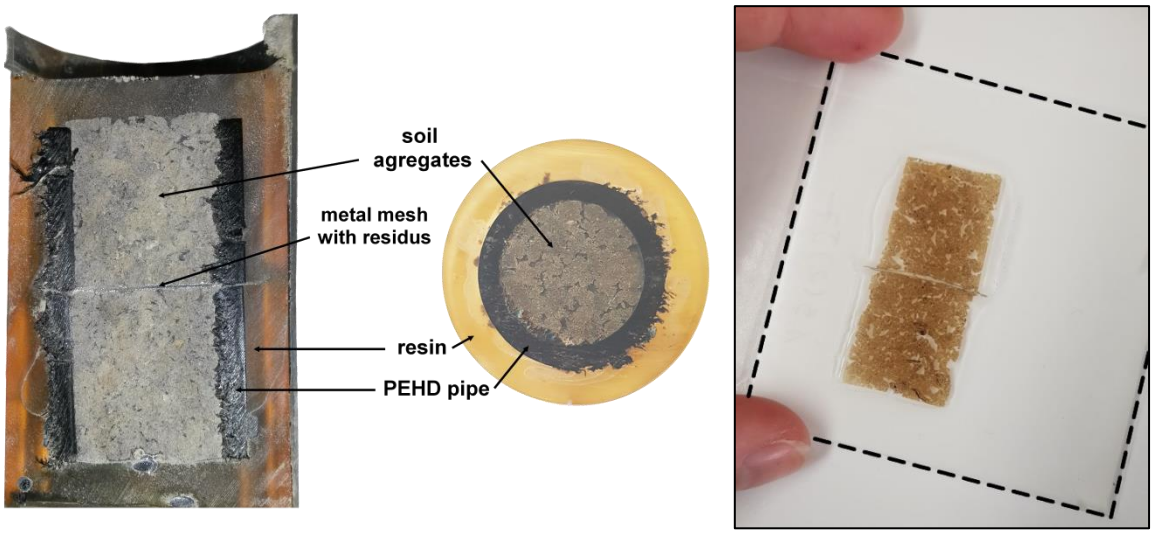
La partie inférieure des microcosmes a été emballée dans une toile de maille 63 µm pour ne pas perdre de sol au cours des immersions répétées nécessaires à l'imprégnation. Les cosmes ont ensuite été plongés au tiers dans une solution de Karnovsky, solution de paraformaldéhyde et de glutaraldéhyde à 25%, permettant une fixation efficace par remontée capillaire d'une grande variété de tissus (Karnovsky, 1965; Vidal et al., 2018). Ils ont ensuite été transférés dans un dessiccateur à température ambiante pendant une heure avec un vide équivalent à -20 kPa pour favoriser la pénétration du liquide dans la porosité (figure 51, étape 1). Les microorganismes (et résidus végétaux) ont dans une étape suivante été marqués par remontée capillaire avec une solution de Calcofluor White dilué à 0,2% (SCRI Renaissance Stain 2200), le Calcofluor White se fixant sur les liaisons β(1,4) et β(1,3) des polysaccharides (Harris et al., 2002). Pour ce faire, les cosmes ont été plongés au tiers dans la solution de Calcofluor White pendant une heure sous un vide à -20 kPa (Nunan et al., 2001) (figure 51, étape 2). Par la suite, les échantillons ont été totalement déshydratés par une succession de bains d'acétone à 30%, 50%, 70%, 90% puis trois bains d'acétone purs (Nunan et al., 2001; Mueller et al., 2012). Chaque bain a été suivi de 20 minutes minimum d'une mise sous vide à -20 kPa pour optimiser la pénétration de l'acétone dans la porosité (figure 51, étape 3). Les échantillons ont ensuite été imprégnés par remplacement progressif de l'acétone par la résine

Araldite GY 502 10900 (Electron Microscopy Sciences) : deux bains dans l'Araldite dilué à 25% puis à 50% dans l'acétone sous vide à -20 kPa ont été réalisés avant de terminer par un bain dans de la résine pure (Mueller et al., 2012; Vidal et al., 2016, 2018; Schlüter et al., 2019) (figure 51, étape 4). Les échantillons ont enfin été chauffés à 60°C dans un four pendant cinq jours et mis de côté jusqu'à durcissement total de la résine.

Les cosmes ont été sciés dans le sens de la longueur avec une scie circulaire (figure 51, étape 5), débarrassés de la résine périphérique en excès ainsi que du tube plastique autour du cosme (figures 52a et 52b), aplanis à l'aide d'une rodeuse et collés sur une lame de verre à l'aide d'une résine Epoxy à prise rapide. Ils ont ensuite été à nouveau abrasés pour atteindre une épaisseur finale de 30 µm à l'aide d'une rodeuse (figure 51, étape 6) puis polis (à l'Université Technique de Munich, au sein du laboratoire de sciences du sol) à l'aide de papiers à différents grains entre 35 µm et 5 µm (CarbiMet, Buehler) et d'un tissu de polissage muni de suspensions diamantées de 1 ; 0,25 et 0.1 µm (Allied High Tech Product) (figure 51, étape 7) afin d'obtenir une surface suffisamment lisse pour les observations en nanoSIMS (Mueller et al., 2012). Les échantillons finaux mesuraient 2 cm sur 4 cm (figures 51 et 2) sur des lames de verre de tailles variables (environ 8 cm de côté) (figure 52c). Une lame mince par cosme a été réalisée.



Figure 51 - Ensemble des étapes de préparation des lames minces: 1 - fixation, 2 - marquage, 3 - déshydratation, 4 - imprégnation, 5 - sciage des cosmes, 6 - amincissement et 7 – polissage.



(a) **(b)** **(c)**

Figure 52 - Organisation des cosmes une fois l'imprégnation terminée et avant la confection des lames minces selon des coupes longitudinales (a) et transversales (b). Lame mince finie avec bord de la lame en verre en pointillés (c).

Une lame a été réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment mais sans marquage au Calcofluor White pour estimer la part d'auto-fluorescence du sol (et sans l'étape finale de polissage car cette lame a été réalisée ultérieurement et le dispositif de polissage n'était plus accessible au moment de sa confection).

6.2.3. Distribution spatio-temporelle des microorganismes totaux

6.2.3.1. Acquisition d'images par microscopie à fluorescence

Les lames minces de sols ont ensuite été observées à l'aide d'une loupe binoculaire Zeiss AXIO.Zoom.V16 muni d'un objectif PlanNeoFluar Z 2.3x et photographiées grâce à une caméra monochromatique AxioCam HR R3 et une lampe Zeiss HXP 120C. Une mosaïque d'images 16-bits a été obtenue pour chaque lame mince de manière semi-automatique (déplacement de la platine automatique et mise au point semi-automatique). La zone ciblée mesurait 4 mm de largeur pour 14 mm de hauteur depuis le résidu vers le sol et ce, dans les deux sens, à partir du lit de résidus. La zone totale analysée était donc un rectangle de 4 sur 28 mm contenant 1862 images à un grossissement x258 et une résolution de 0,25 µm. Un traitement de correction des jointures et des ombres a été appliqué aux différentes images

pour reconstituer la zone totale observée (figure 53).

Les observations de sol sont généralement réalisées à l'aide de microscopes à épifluorescence et non à l'aide de loupes binoculaires comme ici. Nous avons donc comparé ces deux méthodes d'acquisition d'images (sup mat, annexe 1, figures 83 et 84).

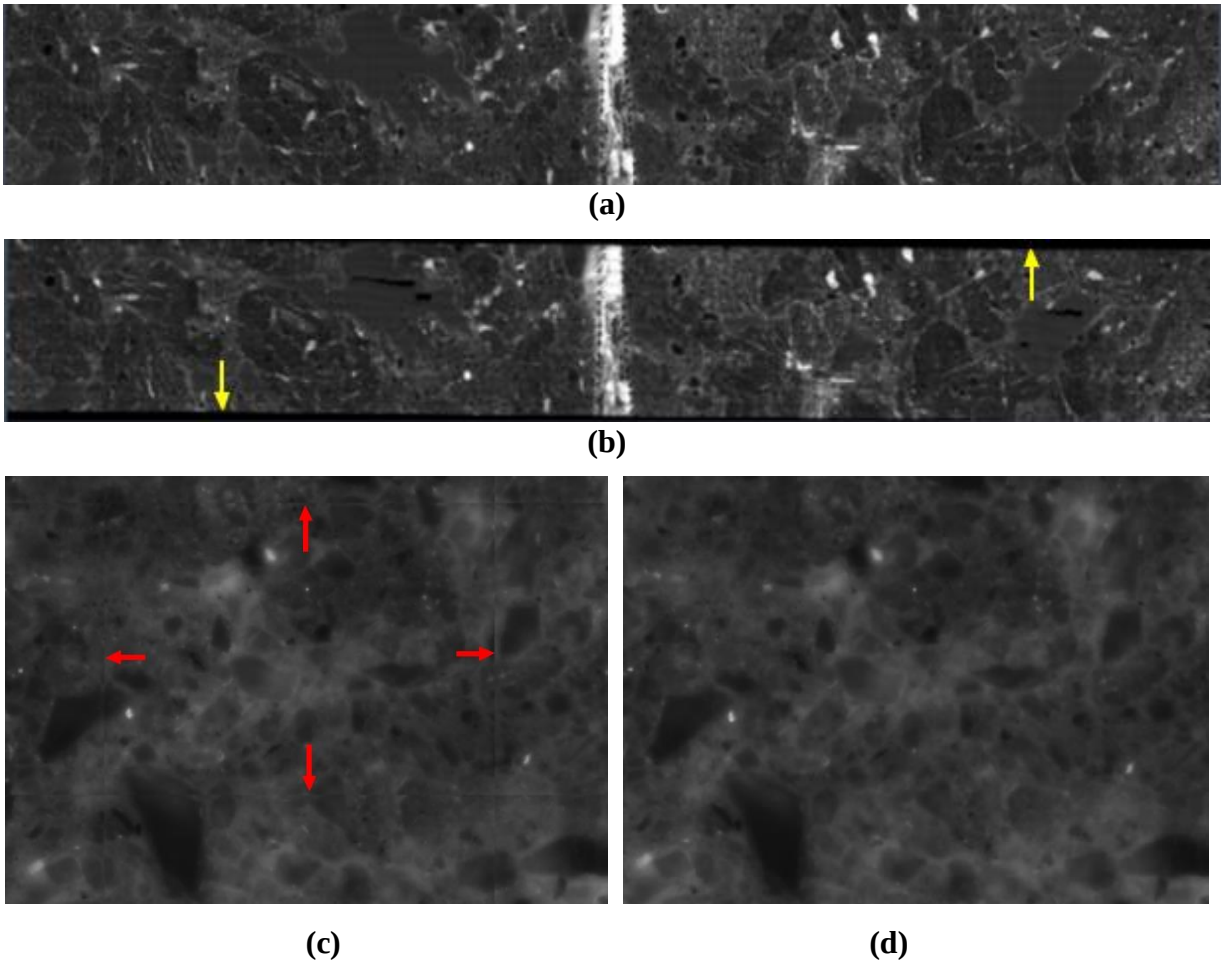


Figure 53 - Résultats du prétraitement des images : images obtenues en fin d'acquisition de la mosaïque totale de 2 par 14 mm (a) et d'une sous partie de la mosaïque (zoom) (c) où l'on observe des zones doubles sur le bord des images (flèches rouges) et après correction (b et d). Après correction de la mosaïque, le réalignement génère des bords noirs (flèches jaunes) (b).

6.2.3.2. Division en zones d'intérêt

Les images totales ont ensuite été divisées en zones d'intérêt correspondant aux zones déjà étudiées dans le Chapitre 3, à savoir sur 4 mm de large et à une distance aux résidus de 0-2

mm, 2-4 mm, 4-6 mm et 12-14 mm. Cela nous a permis dans un premier lieu de travailler sur des images de mêmes dimensions (2 mm x 4 mm) mais aussi de couper les bords noirs de l'image générés par le programme lors du réalignement issu de la première correction (figure 53b). Par ailleurs, cela nous a permis de travailler sur des fichiers moins volumineux et donc de faciliter le traitement d'images.
Pour chaque zone d'intérêt, nous avons sélectionné 3 réplicats sur les 6 disponibles (2 zones équivalentes de part et d'autre des résidus sur chacune des lames minces et 3 lames minces par traitement) en fonction de la qualité des images (problème d'épaisseurs variables des lames suite au polissage, problème de mise au point). Ce travail de découpe a été réalisé avec le logiciel libre d'accès Zeiss ZEN.

Le champ de profondeur obtenu lors de l'acquisition de ces images est de 1.7 µm. Les dimensions (2 mm x 4 mm) et la densité apparente (1.3) des échantillons étant connues, nous avons pu calculer la quantité de sol analysée par lame. Elle est de 17.7 µg et représente 0.0001% de la masse de sol totale contenue dans le cosme (16.33 g).

6.2.3.3. Traitement des images

Le traitement des images développé a été et réalisé en deux étapes menées en parallèle : la première avait pour objectif d'éliminer les zones non exploitables correspondant à des pores ou des minéraux présents dans le sol (figure 54 – A). Etant donné que toutes les images ne comportaient pas la même proportion de minéraux de grandes tailles et surtout de pores, les surfaces pouvant contenir des microorganismes n'étaient pas les mêmes dans toutes les images. Nous avons donc quantifié la part occupée par des pores de grande taille pour pouvoir déterminer les surfaces réellement analysées pour la détection des microorganismes. La seconde étape a consisté à détecter le signal correspondant aux microorganismes (figure 54 – B). Le traitement des images a été réalisé avec le logiciel libre d'accès ImageJ.

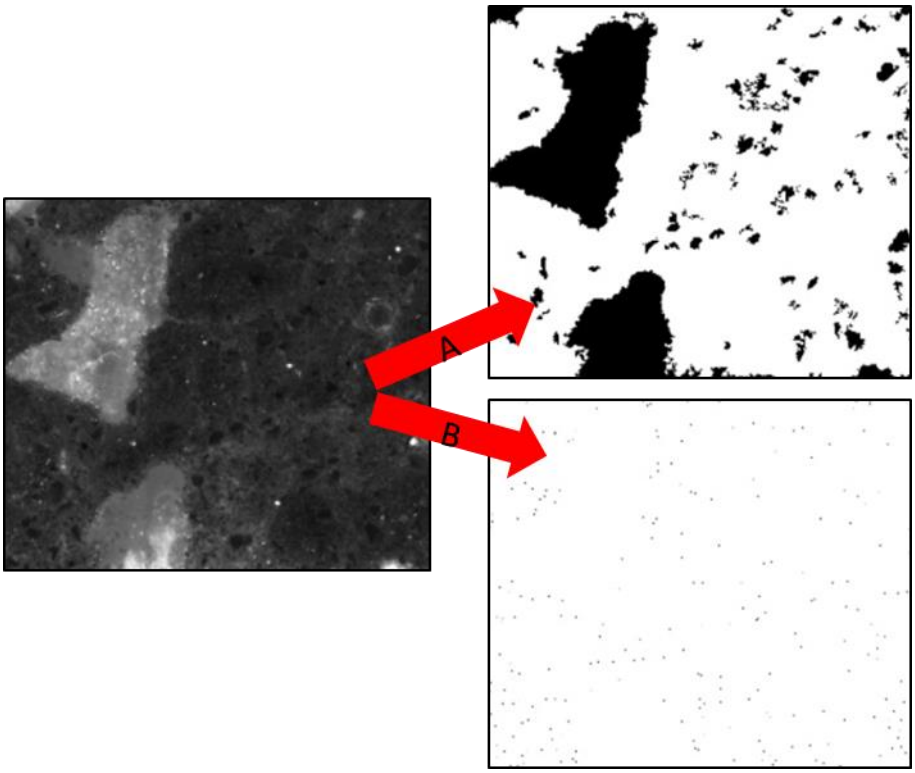


Figure 54 - Schéma général des deux étapes principales du traitement des images. A – détection des zones non colonisées par les microrganismes. B – détection des microorganismes. Sous images de 2 mm par 2 mm.

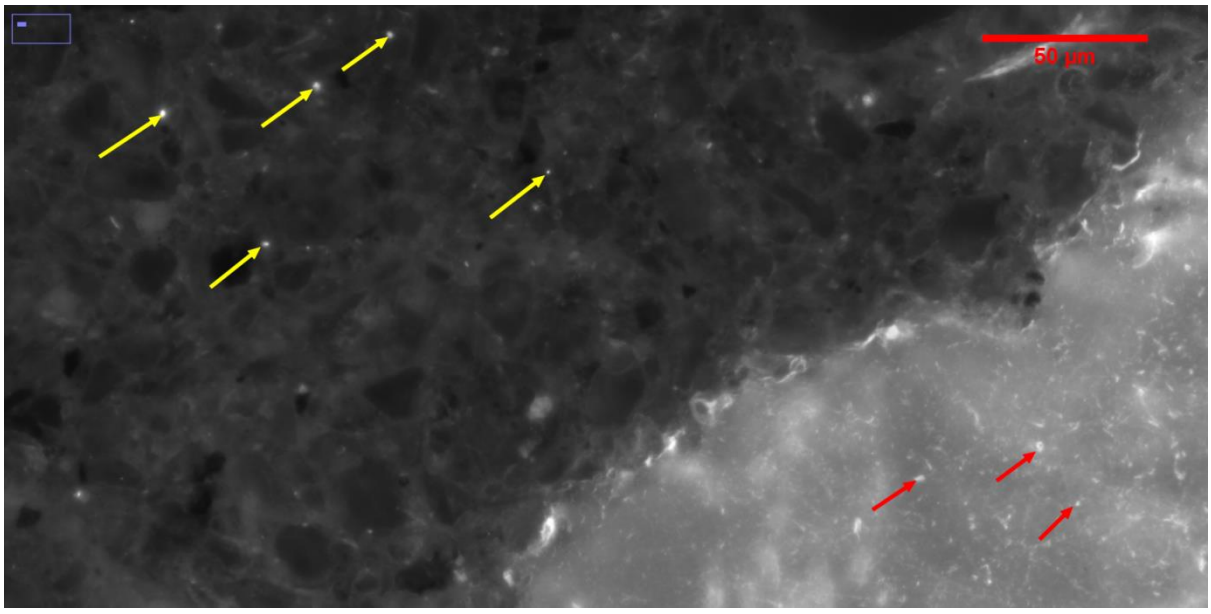
6.2.3.4.. Identification et élimination des zones non exploitables

Sur les images, les microorganismes marqués au Calcofluor White apparaissent sous forme de petits points blancs lumineux sur l'image en niveaux de gris (figure 55a – flèches jaunes). Des faux positifs peuvent également être observés principalement dans les zones où une partie de la résine s'est malheureusement décollée de la lame et qui apparaissent plus claires. Ces zones doivent donc être éliminées du traitement d'image (figure 55a – flèches rouges).

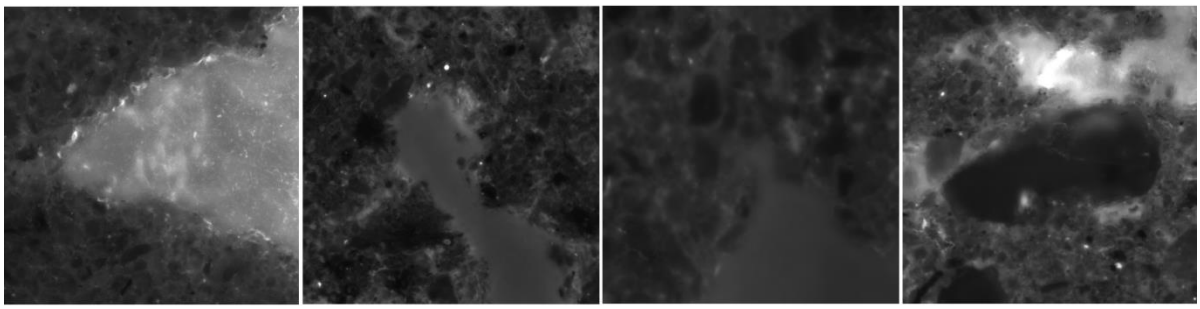
De plus, les images correspondant à un traitement donné peuvent être très variables d'une répétition à une autre (nombre et taille des pores, présence de minéraux…). Pour pouvoir rapporter le nombre de microorganismes à une quantité de sol analysé, il faut donc également quantifier les surfaces occupées par des pores (figures 55b et 55c) et des grands minéraux (figure 55e). Les zones à éliminer peuvent avoir plusieurs caractéristiques. La porosité est facilement repérable car la résine présente par endroit un aspect très clair (figure 55b) à cause d'un souci de décollement de la résine de collage. Lorsque qu'il n'y a pas ce défaut, les pores

restent quand même bien visibles car si on les compare au reste de l'image, ils sont d'un gris très homogène sur toute la surface du pore (figure 55c). Les zones floues (figure 55d) et les minéraux de grande taille (figure 55e) se repèrent également car leur surface est homogène. Les zones à éliminer ont donc été identifiées sur des critères de couleur, de taille et de netteté.

La détection de ces zones a été réalisée en deux temps (figure 56) : (i) détection des zones claires ne correspondants pas à des microorganismes (c'est-à-dire ne correspondant pas à des points) (porosité « claire ») (figure 56 – étapes 1 à 3) et (ii) détection des zones homogènes et étendues (porosité « sombre », minéraux, zones floues) (figure 56 – étapes 4 à 10).



(a)



(b) **(c)** **(d)** **(e)**

Figure 55 - Descriptif général des images avec le type d'objets et artéfacts généralement observés. Sol avec microorganismes (flèches jaunes) et artéfacts (flèches rouges) (a). Sous images de : pore « clair » avec problème de décollement de résine (b), pore « sombre » (c), zone floue (d) et minéral de taille importante (e).

6.2.3.5. Identification des zones claires

Les zones claires correspondant à des pores de grande taille ont été distinguées du reste de la matrice du sol par binarisation de l'image (figure 56 – étape 1). Le seuil de binarisation a été déterminé à partir de l'histogramme, défini pour chaque image, représentant le nombre de pixels de cette image pour chaque niveau de gris (à chaque intensité de gris de l'image est attribuée une valeur, allant de 0 pour le noir à 65535 pour le blanc sur une image 16-bit). Le seuil de binarisation correspond alors à la valeur en dessous de laquelle tous les pixels gris sont transformés en pixel noirs de valeur 0 et au-delà de laquelle tous les pixels gris sont transformés en pixels blanc de valeur 65535. Cette valeur a été déterminée par la méthode du triangle (sup mat, figure 81). Cette méthode est particulièrement bien adaptée pour les répartitions monomodales des pixels, c'est-à-dire ne présentant qu'un seul pic : le mode, étant défini comme la valeur du niveau de gris pour laquelle l'effectif de pixels est maximal. Suite à ce traitement, nous n'avons conservé que les objets identifiés de plus de 1000 µm², ce qui correspond à la taille des particules minérales que nous souhaitons éliminer, à savoir principalement des sables (figure 56 – étape 2) et avons appliqué un filtre « fill hole » afin de remplir les « trous » qui peuvent apparaitre dans certains objets (se caractérisant par des pixels blancs au sein des objets constitués de pixels noirs) et pouvoir corriger d'éventuels artéfacts (ces « trous » ne correspondant pas à des inclusions de sol dans les pores en 3D mais plutôt à des artéfacts) (figure 56 - étape 3). A l'issue de ce traitement, les zones « claires » apparaissent en noir et la phase solide en blanc.

6.2.3.6. Identification des zones homogènes

Cette partie du traitement de l'image a pour but d'identifier les zones homogènes de porosité, les minéraux de grande taille ainsi que les zones floues. Une première étape a consisté à supprimer le bruit de l'image (pixels parasites présents dans l'image acquise pouvant être d'origine diverse) à partir d'un flou moyen de l'image (avec un voisinage de 2 pixels) (figure 56 – étape 4). L'opération consiste à appliquer à chaque pixel une valeur de nuance de gris correspondante à la moyenne des valeurs de nuance de gris des pixels qui l'entourent (voisinage), ce qui permet d'éliminer les pixels dont la valeur est aberrante (bruit). Puis une

opération « Edge detector » a permis de faire apparaitre les zones de l'image où l'on observe des discontinuités, à savoir les zones où la clarté de l'image est modifiée de façon abrupte (figure 56 – étape 5). Une faible densité de ces discontinuités indique les zones homogènes de l'image que nous recherchons. Une binarisation de l'image basée sur la méthode de Huang (figure 56 – étape 6) (sup mat, figure 82), couplée à une dilatation des discontinuités (maximum avec un voisinage de 20 pixels) (figure 56 – étape 7), a permis de distinguer les zones de l'image sans discontinuité formant des espaces vides. Ces espaces ont alors pu être délimités comme des objets via Particles Analyzer. A l'issue de ce traitement, les zones homogènes apparaissent en blanc et les non homogènes en noir et l'on procède donc à une inversion des pixels noirs et blancs (figure 56 – étape 8). Un filtre « fill hole » est également utilisé (figure 56 – étape 9) afin de remplir les « trous ». Les zones homogènes apparaissent alors en noir et les zones hétérogènes en blanc. Suite à ce traitement, n'ont été conservés que les objets identifiés de plus de 1000 µm² (figure 56 – étape 10).

La superposition des traitements ayant permis la délimitation des zones « claires » et « homogènes » (figure 56 – étape 11) a permis de définir les zones qui ne doivent pas être prises en compte pour la détection des microorganismes. En moyenne, ces zones représentent 19% de la surface des images (entre 3 et 42% de la surface selon les images) (figure 57).

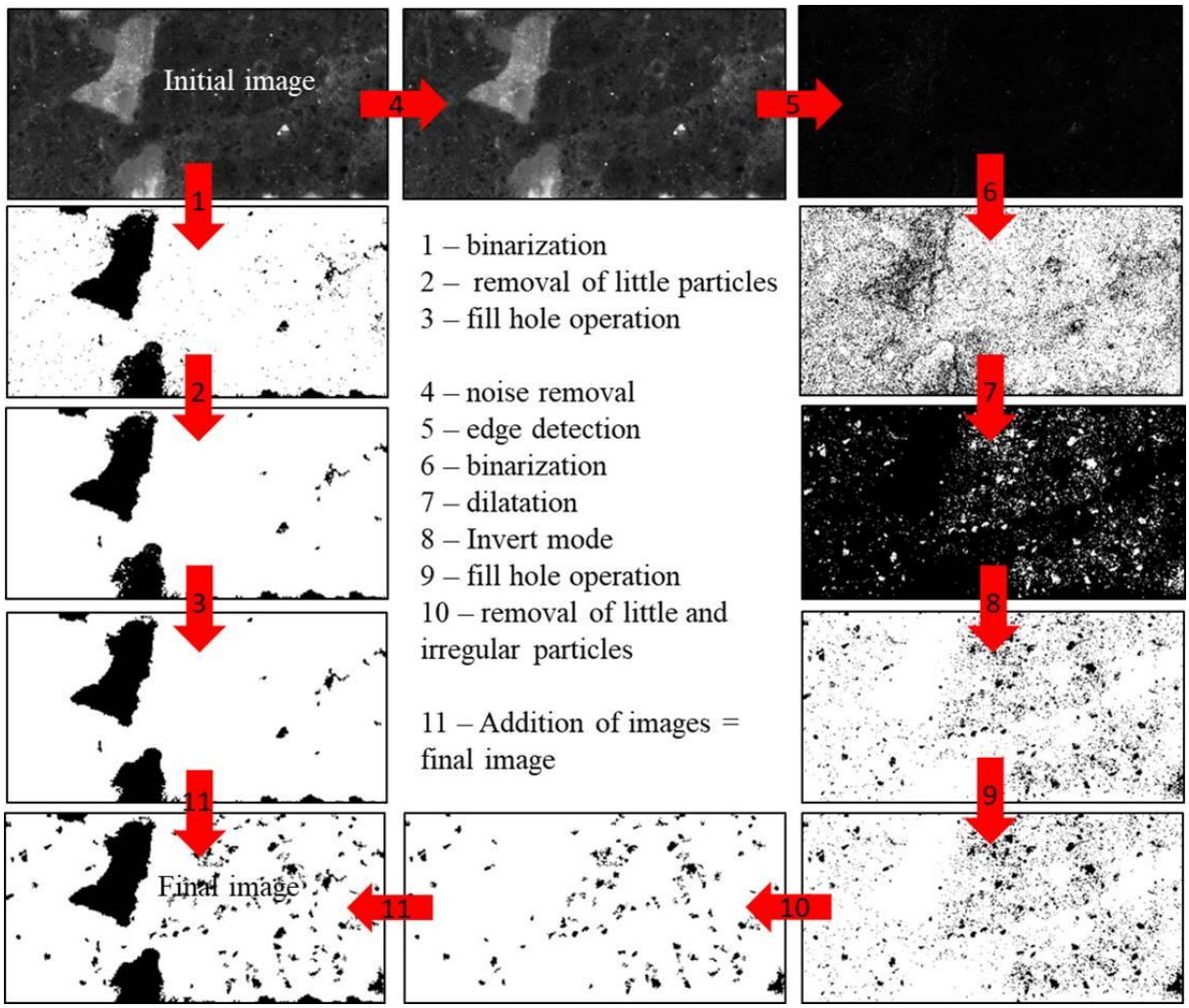
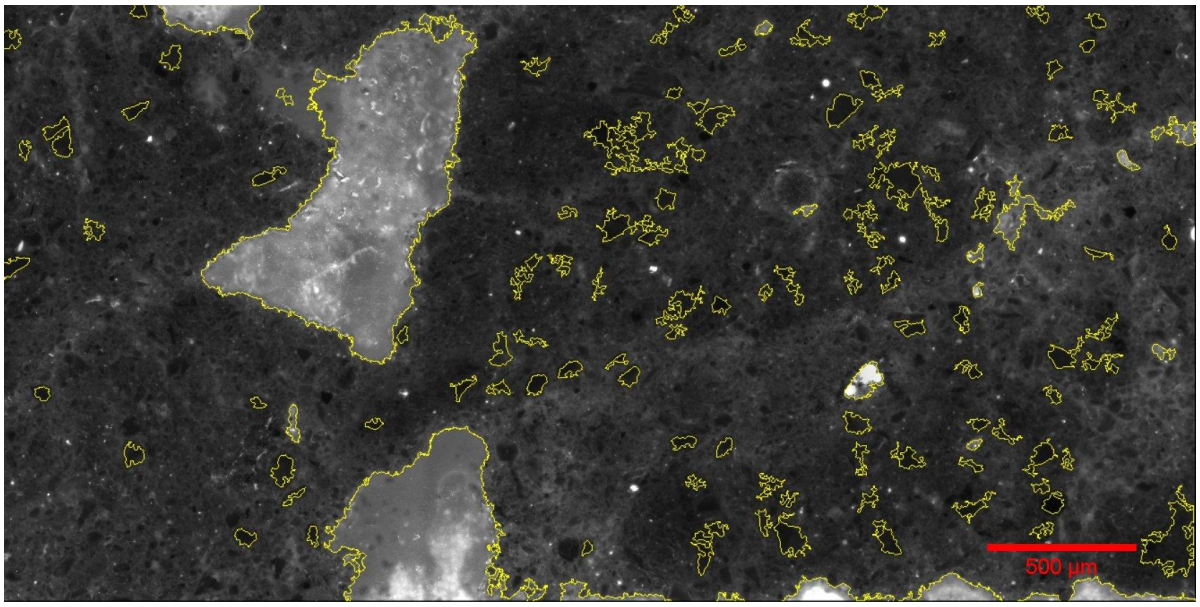
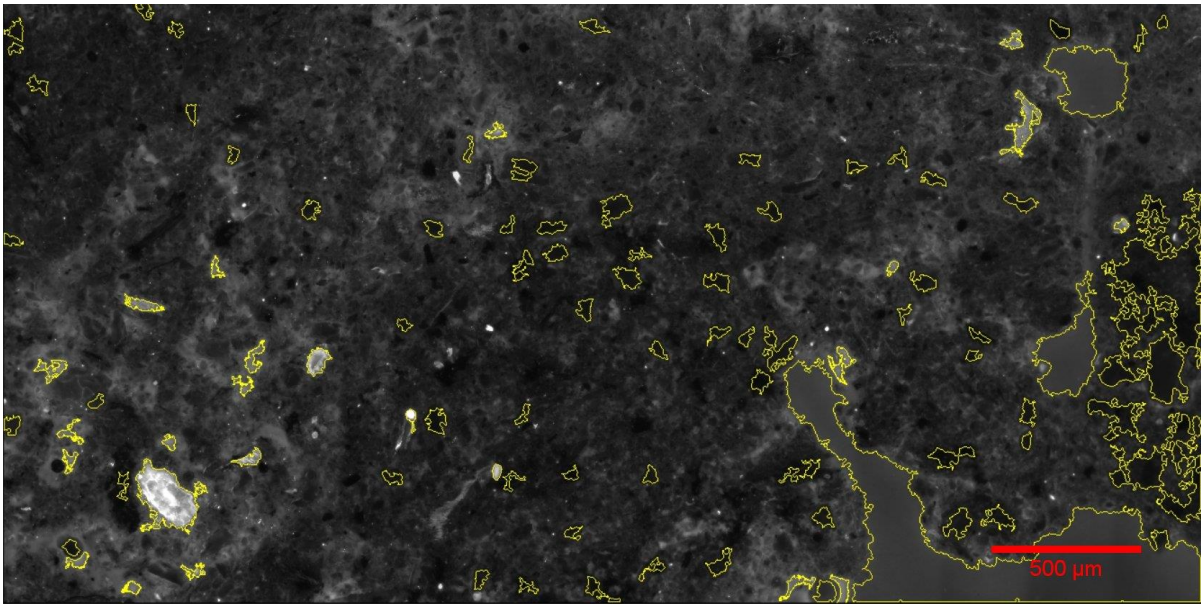


Figure 56 - Schématisation de l'ensemble des opérations ayant permis de sélectionner les zones correspondant aux pores et aux zones fortement homogènes. Images de 4 mm par 2 mm. .



(a)



(b)

Figure 57 - Exemples d'images traitées avec la méthode développée pour éliminer les zones claires et homogènes (cerclées de jaune).

6.2.3.7. Identification du signal microbien

Les microorganismes du sol, marqués au Calcofluor White, apparaissent sous forme de petits points blancs lumineux sur un fond plus sombre correspondant à la matrice du sol.

Après une opération permettant de contraster l'image (maximum avec un voisinage de 2 pixels) (figure 58 – étape 2), une opération « Substract background » permet de distinguer les microorganismes du fond de l'image, relativement homogène (figure 58 – étape 3). Cette opération consiste en une soustraction de l'image étudiée avec la même image suite à l'application d'un flou. Ainsi ne ressortent dans l'image que les objets se dégageant du fond comme les microorganismes qui nous intéressent. L'image obtenue a ensuite été binarisée manuellement pour obtenir une image finale comportant les informations « est » ou « n'est pas » signal. Aucun seuil satisfaisant n'ayant pu être obtenu avec les méthodes automatiques disponibles, celui-ci a été estimé visuellement et le même seuil de 1500-65535 a été appliqué pour toutes les images (figure 58 – étape 4). Les objets détectés correspondent à des microorganismes mais peuvent également correspondre à de faux positifs (exemple de résidus végétaux), le Calcofluor White se fixant sur les polysaccharides. Les images ont donc dû être "nettoyées" et les faux positifs ont été éliminés sur la base de la forme et de la taille des objets. La taille des microorganismes correspond à minima à la taille d'une bactérie (environ 1 µm) et au maximum à celle d'une colonie mais cette taille est difficile à définir car elle peut varier. En théorie, les colonies contiennent moins d'une dizaine de cellules, mais des colonies de plusieurs centaines d'individus ont également été observées à la surface des agrégats (Frey, 2015). Nous avons fait le choix de supprimer tout objet de plus de 50 µm² et dont la circularité n'était pas comprise entre 0.7 et 1 (Nunan et al., 2001). Ce traitement a été réalisé *via* l'application « Particles Analyzer » (figure 58 – étape 5). Tout signal détecté dans les zones claires et homogènes définies par le traitement présenté précédemment a également été éliminé (figure 58 – étape 6 et figure 59).

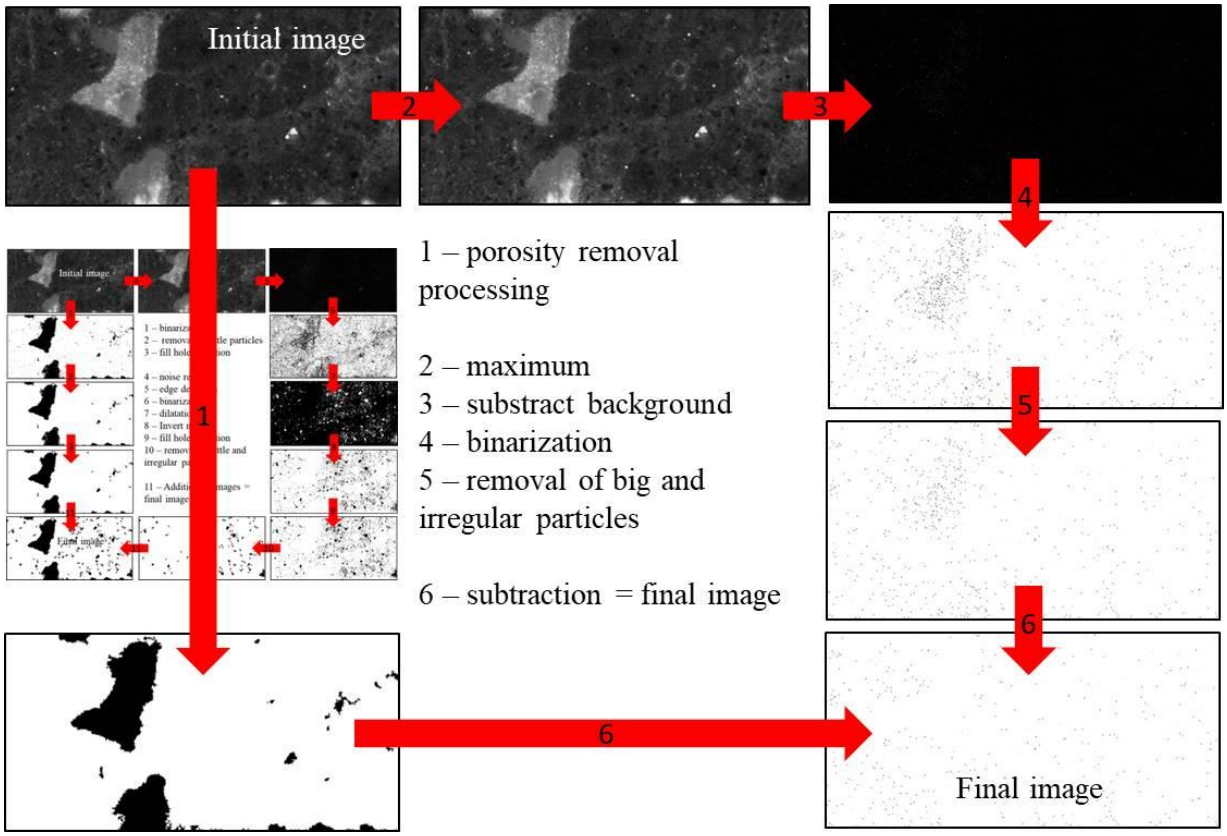


Figure 58 - Schématisation de l'ensemble des opérations ayant permis de sélectionner les objets correspondants aux microorganismes sur la zone à étudier. Images de 4 mm par 2 mm.

A partir des images générées, nous avons pu déterminer le nombre de microorganismes et de pores par image, l'aire totale occupée par ces objets et leur taille moyenne en utilisant l'application « Particles Analyzer ». Le nombre de microorganismes a été normalisé par la surface d'image analysée (cf élimination des pores, gros minéraux, zones floues).

Les critères permettant de détecter les microorganismes étant des critères de taille et de forme, il est important de noter que la détection des champignons est très certainement sous-estimée. En effet, la méthode mise en place permet principalement de sélectionner les coupes d'hyphes dont le diamètre et la circularité concordent avec les seuils appliqués (figure 58 – étape 5) mais est peu adaptée pour détecter les hyphes qui sont parallèles à la lame.
Enfin, en raison de la résolution et de la qualité des images, il ne nous a pas été possible de distinguer les bactéries les unes des autres dès lors qu'elles sont co-localisées. C'est pourquoi le signal « microorganismes » extrait est plutôt qualifié de colonies par la suite.

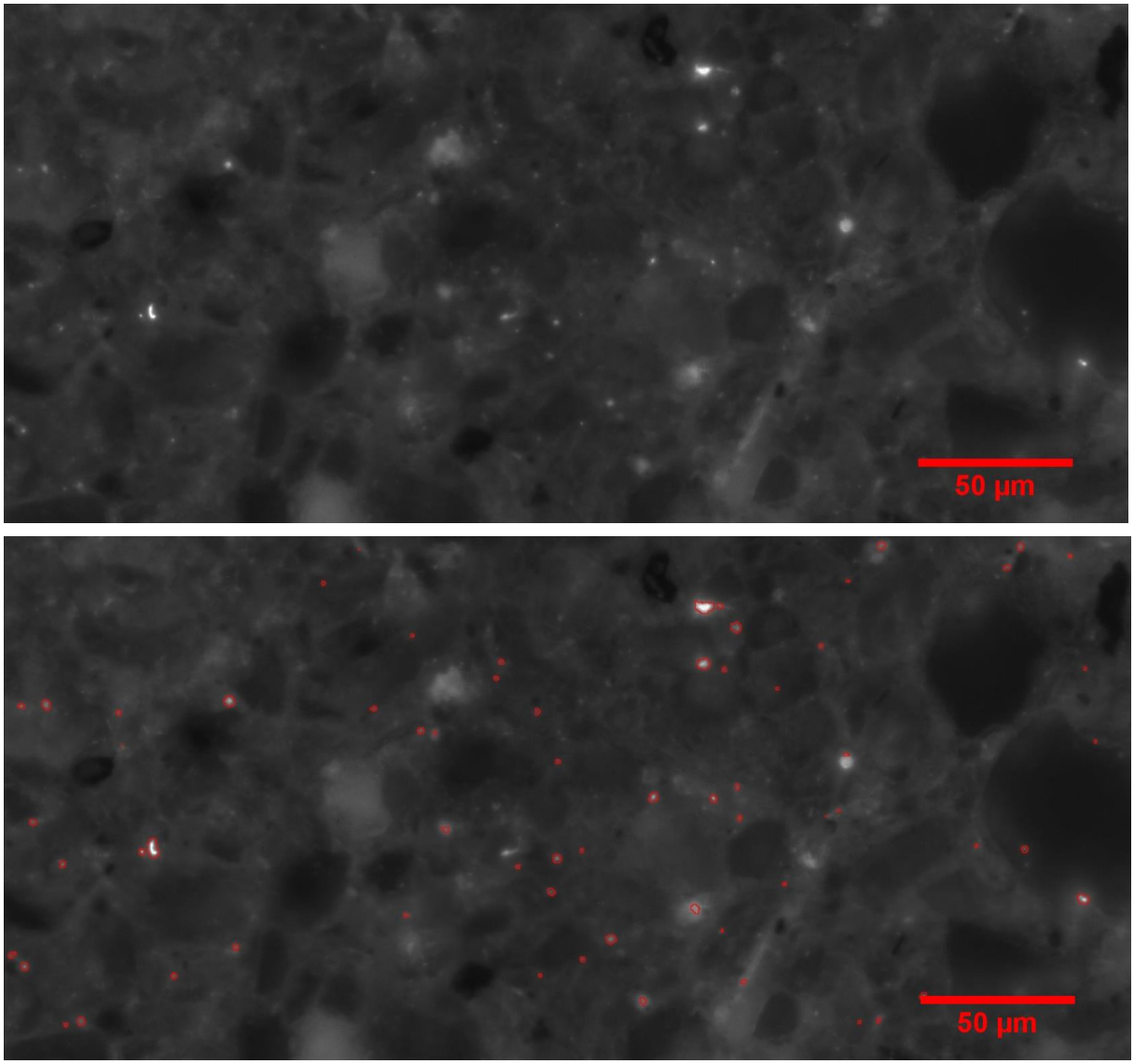


Figure 59 - Exemple d'image traitée permettant de détecter les microorganismes (cerclés de rouge).

6.2.3.8. Validation de la méthode de détection

Pour s'assurer de l'efficacité de la méthode de détection des microorganismes, un test de validation a été effectué sur 12 images choisies aléatoirement parmi l'ensemble des images, soit 4 images par pF (1,5 ; 2,5 et 3,5), 3 images par dates (3, 7, 15 et 45 jours) et 3 images par distances (0-2mm, 2-4 mm, 4-6 mm et 12-14 mm) sur des sous parties des images de 250µm de côté à des emplacements aléatoires sur l'image.

A partir des images sélectionnées, une matrice de confusion a été développée permettant de

mettre en parallèle les données estimées et les données réelles (obtenues par sélection manuelle). Ce type de matrice permet d'estimer d'une part la quantité (i) de faux positif (objets détectés par la méthode ne correspondant pas à des colonies), (ii) de faux négatifs (colonies non détectées) et (iii) d'objets correctement détectée (objets détectés correspondants à des colonies). Nous avons ainsi pu calculer deux indicateurs de qualité : la précision du producteur et la précision utilisateur.

La précision producteur quantifie la proportion d'objets correctement détectés par la méthode par rapport au total d'objets sélectionnés manuellement, soit :

$$Précision\ du\ producteur = \frac{nombre\ d'objets\ bien\ classsés}{nombre\ d'objets\ bien\ classés + faux\ négatifs} \times 100$$

La précision de l'utilisateur correspond à la proportion d'objets correctement détectés par la méthode par rapport au total d'objets détectés par la méthode, soit :

$$Précision\ de\ l'utilisateur = \frac{nombre\ d'objets\ bien\ classsés}{nombre\ d'objets\ bien\ classés + faux\ positifs} \times 100$$

6.2.3.9. Distribution des microorganismes à l'échelle micrométrique : aléatoire ou agrégée

La distribution des colonies à l'échelle µm a été étudiée après 3 et 45 jours d'incubation pour les pF1,5 et pF3,5 via l'indice de Ripley qui permet l'analyse de motifs de points et qui se définit comme suit :

$$K(r) = \frac{1}{\lambda} E$$

Où r est le rayon du cercle au sein duquel la répartition est étudiée (5, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, et 250 µm), λ est le nombre d'évènements (colonies dans notre cas) par unité de surface et E correspond aux évènements supplémentaires intervenus à l'intérieur du cercle de rayon r autour d'un évènement (une colonie) choisi de façon aléatoire. Cette même fonction est ré-exprimée sous la forme :

$$L(r) = \sqrt{\frac{K(r)}{\pi}}$$

La fonction L, permettant de déterminer l'écart à une répartition totalement aléatoire, a été agrémentée d'un intervalle de confiance généré après calculs des valeurs obtenues sur 99 répartitions aléatoires de points.

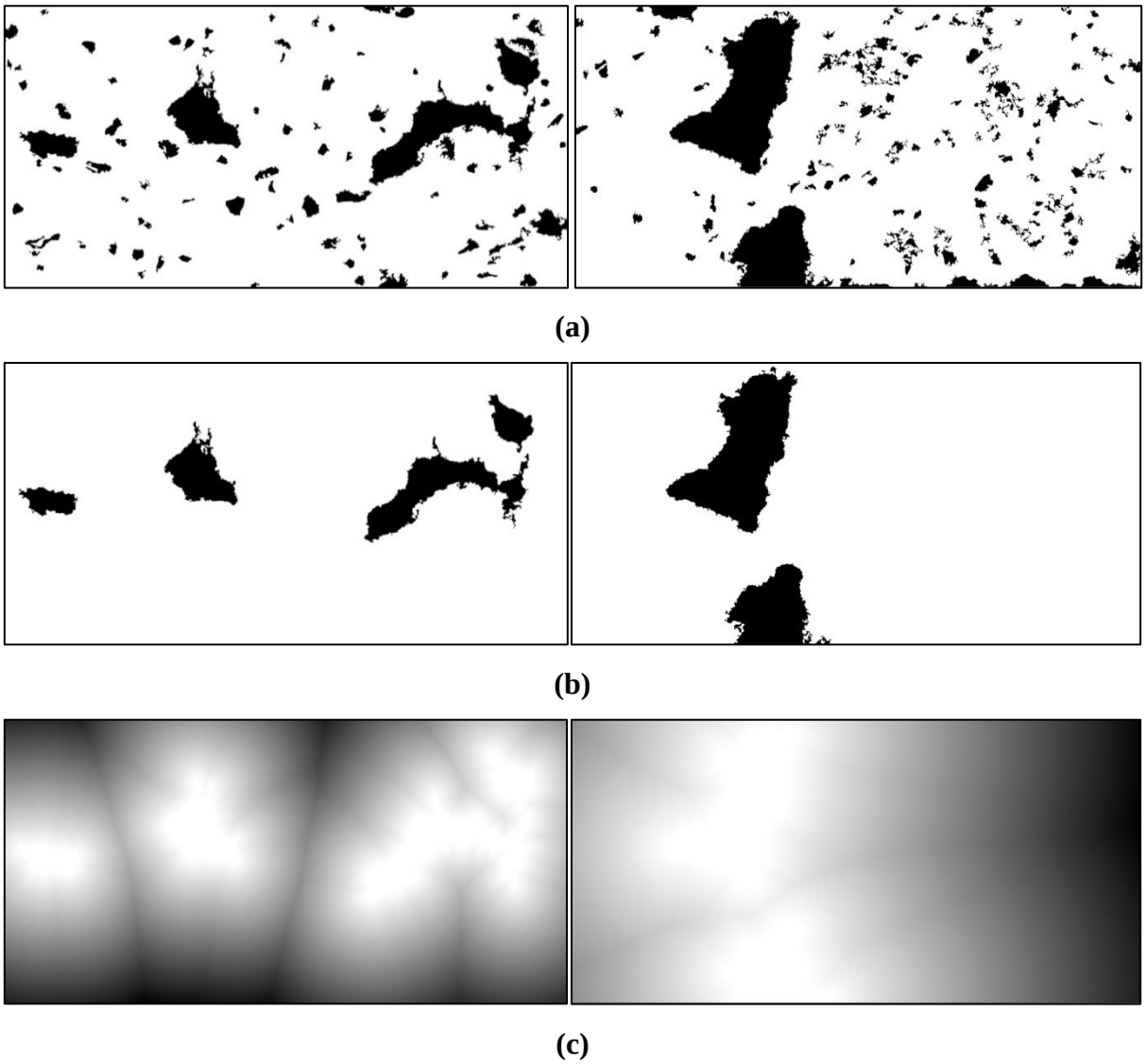
On considère les colonies comme étant agrégées dès lors que la valeur obtenue pour une certaine distance est supérieure à la valeur supérieure de l'intervalle de confiance obtenu pour la même distance (ratio valeur mesurée/valeur haute intervalle de confiance > 1). Quand la valeur obtenue est inférieure à la valeur minimale de l'intervalle de confiance, alors on considère que les points sont dispersés (ratio valeur mesurée/valeur basse intervalle de confiance < 1) (Nunan et al., 2002; Raynaud et Nunan, 2014). Le degré d'agrégation est obtenu pour chaque image.

Ces indices ont été calculés sur des sous-parties des images initiales. En effet, il a été nécessaire d'écarter la présence de pores importants pour effectuer cette étude de répartition des objets. Ainsi des surfaces de 1000 µm² dans les zones sans pores pour chaque image ont été sélectionnées. Ces indices ont été obtenus avec le package « Spatstat » de R (Baddeley et al., 2015).

6.2.3.10. Distribution des microorganismes par rapport à la surface du macropore le plus proche.

La localisation des colonies en fonction de la distance aux macropores a été étudiée pour les pF1,5 et pF3,5 et aux dates J3 et J45, avec 3 lames par traitement (soient 12 lames au total) comptant chacune quatre zones étudiées (0-2 mm, 2-4 mm, 4-6 mm et 12-14 mm) (soient 48 images au total).
L'analyse a été réalisée en considérant les pores de plus 0,05 mm², seuil déterminé à l'aide de l'histogramme de répartition des pores et minéraux selon leur taille, dans le but d'écarter les plus petits objets (minéraux) et de ne conserver que les objets les plus gros et les moins fréquents correspondant aux macropores (sup mat, figure 85). Les pores de taille supérieure à 0.05 mm² ont été identifiés sur chacune des images (figures 60a et 60b). Il a ensuite été appliqué un filtre de distance « distance map » générant une image en niveaux de gris (32-bits) des distances euclidiennes aux pores présélectionnés. Chaque pixel a alors été remplacé

par un pixel dont le niveau de gris est relatif à la distance aux pores de taille supérieure à 0.05 mm² le plus proche (figure 60c).



(a)

(b)

(c)

Figure 60 – Image binarisée des pores obtenus par la méthode décrite dans la figure 56 (a). Même image obtenue après soustraction des pores inférieurs à 0.05 mm² (b). Image de la carte des distances créée à l'aide de l'image b (c). Les pores apparaissent en blanc et les niveaux de gris correspondent à la distance d'un pixel donné au pore le plus proche (plus un pixel est clair, plus il est proche d'un pore et inversement). Images de 4 mm par 2 mm.

Les colonies qui ont été projetées sur cette image possèdent un niveau de gris moyen dont l'intensité est fonction de la distance au macropore le plus proche (figure 61). Il est donc possible d'analyser la localisation des colonies par rapport au macropore le plus proche (Nunan et al., 2003; Schlüter et al., 2019).

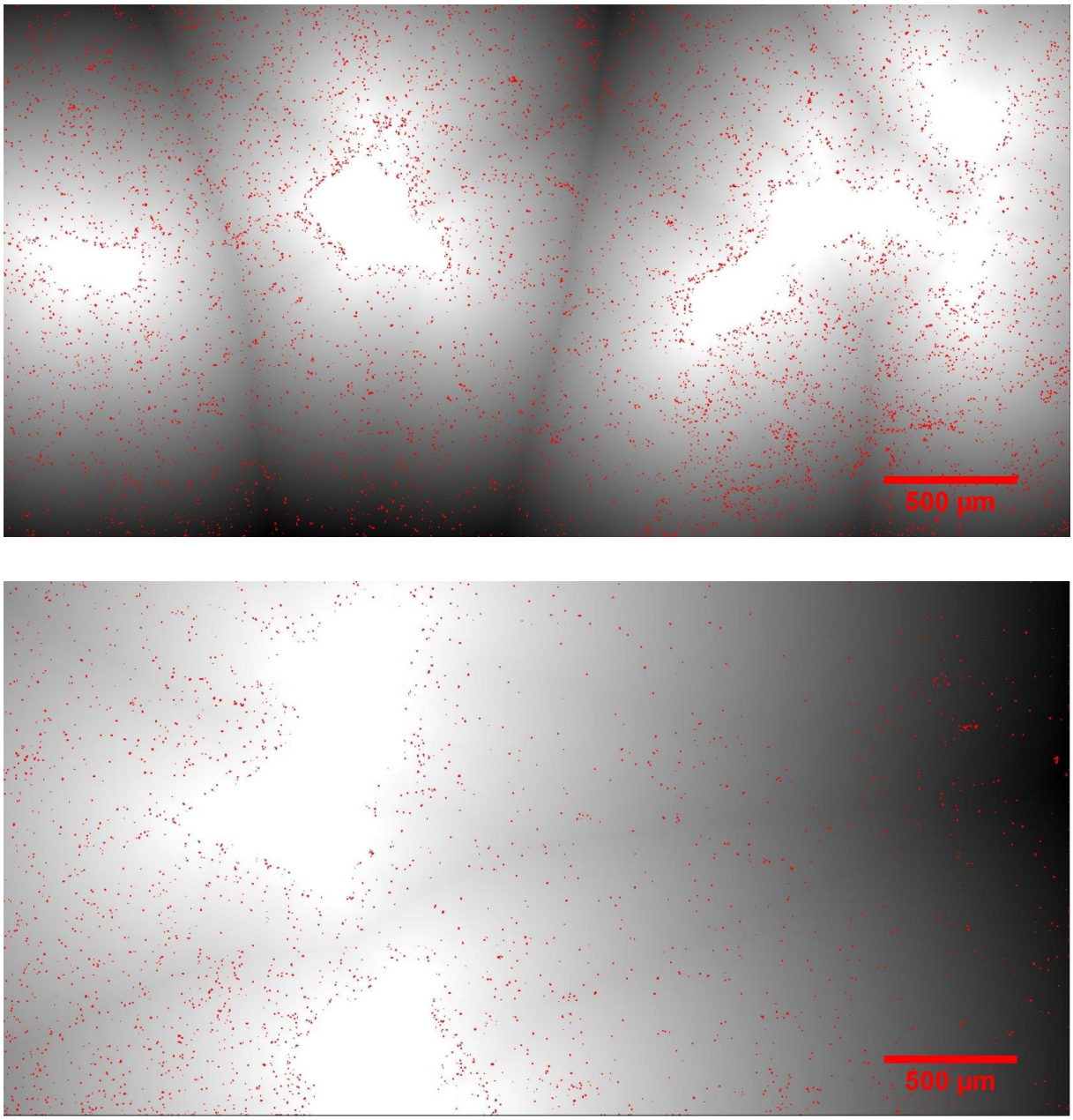


Figure 61 - Superposition des colonies sur les cartes des distances aux macropores.

Le nombre des colonies par niveaux de gris nous informe ainsi sur la localisation des microorganismes selon la distance aux macropores. Pour cela, nous avons utilisé l'histogramme de répartition des niveaux de gris des colonies à partir duquel on extrait le mode, à savoir la valeur pour laquelle la fréquence est la plus forte. Dans ce cas, les valeurs peuvent aller d'une intensité de valeur 1 (pixels blancs) où la colonie est au contact du macropore, jusqu'à une valeur théorique maximale possible de 4 294 967 295 (pixels noirs) puisque pour des distances en 32-bits, chaque niveau de gris correspond à un équivalent distance de 0,25µm. La distance aux pores a été étudiée via des histogrammes de classes

équivalentes à des distances de 10 µm.

6.2.4. Distribution spatio temporelle des microorganismes dégradants (nanoSIMS)

6.2.4.1. Préparation des lames et acquisition

Pour des contraintes de temps de préparation, d'acquisition et de disponibilité des appareils, seuls 3 échantillons ont pu être analysés en nanoSIMS. Les deux humidités extrêmes présentant des différences plus marquées en termes de minéralisation des résidus, les pF1,5 et pF3,5 ont été préférés au détriment du pF2,5. Nous avons également choisi d'analyser des échantillons au jour 7 où la minéralisation des résidus était maximale et au jour 45, en fin d'incubation. Ainsi un réplicat pour chacune des modalités pF1,5-jour 7, pF1,5-jour 45 et pF3,5-jour 45 a été choisi.
Les lames acquises et analysées pour la microscopie à fluorescence ont ensuite été recoupées (2,5 cm² ou 1 cm² correspondants aux tailles des emplacements disponibles sur les portoirs utilisés pour la nanoSIMS) à l'aide d'un coupe-verre de sorte à conserver les zones au contact du résidu. Les lames ajustées à la bonne taille ont ensuite été recouvertes d'une couche d'or de 10 nm afin de rendre leur surface conductrice et placées dans le nanoSIMS où une mise sous vide, nécessaire au fonctionnement de l'appareil, a été effectuée sur plusieurs jours.
Les zones d'intérêt proches du résidu ont été bombardées par un faisceau d'ions Cs^+ pour obtenir des images de 30 x 30 µm² avec une résolution de 256 x 256 pixels (nanoSIMS 50L Cameca, Allemagne). Chaque image a demandé environ 1h30 d'acquisition.

Les images ^{12}C, ^{13}C, ^{16}O, $^{12}C^{14}N$, ^{28}Si, $^{27}Al^{16}O$ et $^{56}Fe^{16}O$ des ions secondaires ont été obtenues sur 60 plans (60 images réalisées successivement sur la même surface, utiles par la suite pour corriger le bruit des images acquises) et accumulés pour chaque image finale.
Au regard des difficultés rencontrées lors des acquisitions (temps d'acquisition élevé, impossibilité de savoir avec certitude si une zone présentait un marquage lorsqu'il était faible avant la fin de l'acquisition, difficultés à identifier des zones marquées, évitement des zones présentant de gros minéraux pouvant être à l'origine d'artéfacts, temps nécessaire au changement d'échantillon, impossibilité de revenir sur un échantillon une fois qu'il est sorti de l'appareil sans avoir à refaire le vide, etc…), un nombre inégal d'images a été acquis sur

les échantillons en fonction des stratégies adoptées (tableau 8).

Tableau 8 - Récapitulatif des images réalisées en nanoSIMS

modalités	Zones acquises	Nombre d'images
pF1,5 jour 7	Dans le résidu vérification du marquage)	1
	Au contact du résidu (0 mm)	10 dont 9 ayant servi pour réaliser 3 mosaïques de 90 µm
pF1,5 jour 45	A proximité du résidu (0,05 et 0,5 mm)	2
	A distance du résidu (distance non relevée)	1
pF3,5 jour 45	Au contact et à proximité du résidu (0 ; 0,4 ; 0.5 et 1 mm)	4
	A distance du résidu (17 mm) (près d'un hyphe)	1

6.2.4.2. Traitement des images

Le traitement des images a été effectué à l'aide d'Image J et notamment du plugin « OpenMIMS ».

En premier lieu une correction des temps morts (période pendant laquelle le détecteur n'a compté qu'un seul ion secondaire) a été effectuée (Mueller et al., 2013) puis les 60 plans acquis par image ont été assemblés en une image finale unique (32-bits). Les ratios $^{13}C/^{12}C$ ont alors été calculés (sur un intervalle max = 0,03 et min = 0,01) après application d'un filtre médian (radius = 2). Les zones considérées comme étant marquées au ^{13}C sont celles qui présentaient un ratio supérieur à 0,012, l'enrichissement naturel du sol étant aux alentours de 0,011 (Vidal et al., 2018).

Certaines images $^{13}C/^{12}C$ présentaient un effet de charge au contact de gros minéraux, effet dû au fait que certains matériaux peu conducteurs accumulent à leur surface des électrons provoquant une surbrillance venant gêner les acquisitions (figure 62d).

Les zones minérales n'apparaissent pas dans les images représentant le $^{12}C^{14}N$ correspondant à des objets organiques (figure 62a). Les zones correspondant à l'emplacement des minéraux

apparaissent donc noires sur ces images (figure 62a) et il est alors possible distinguer les zones minérales des zones organiques par binarisation manuelle (même seuil de 700 utilisé pour toutes les images) (figures 62b et 62c). Les zones minérales ont ainsi pu être éliminées des images du ratio $^{13}C/^{12}C$ (figure 62e et 62f).

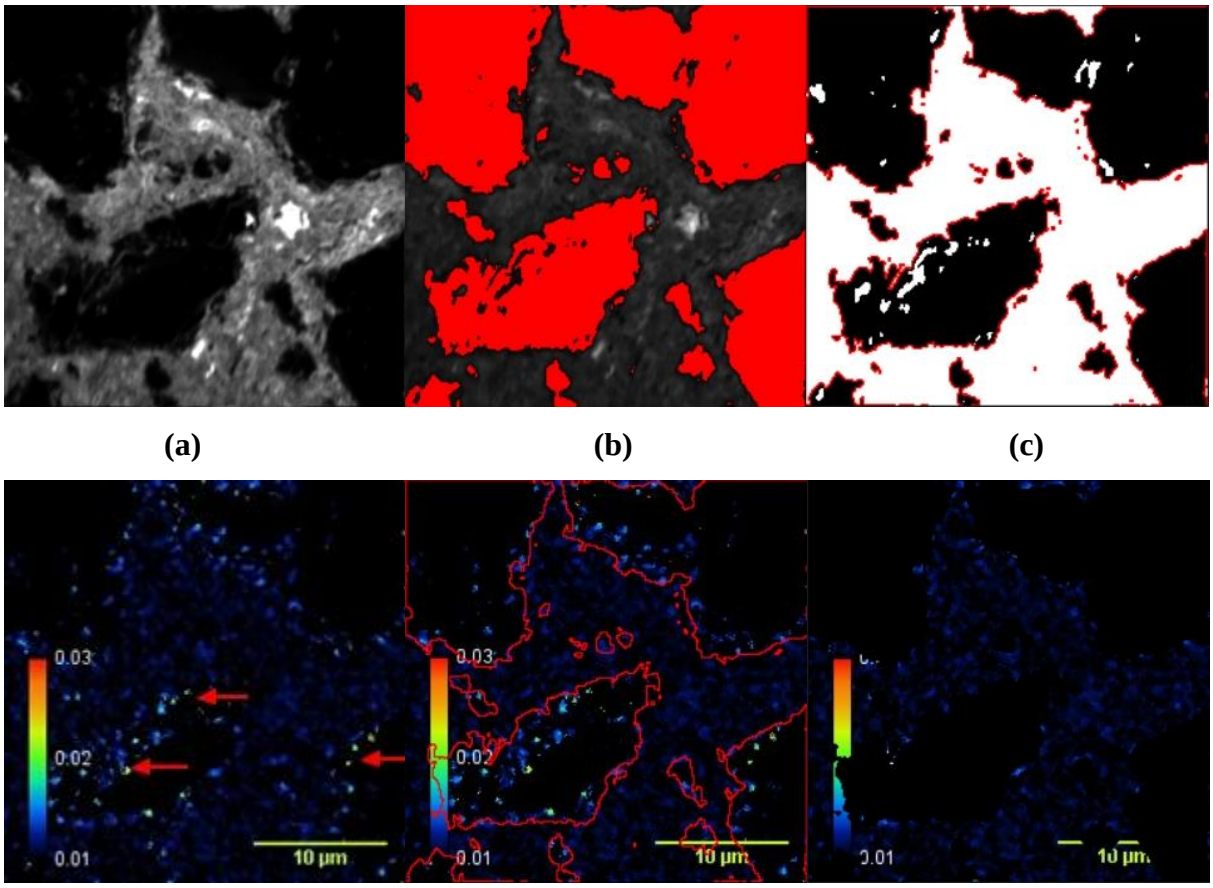
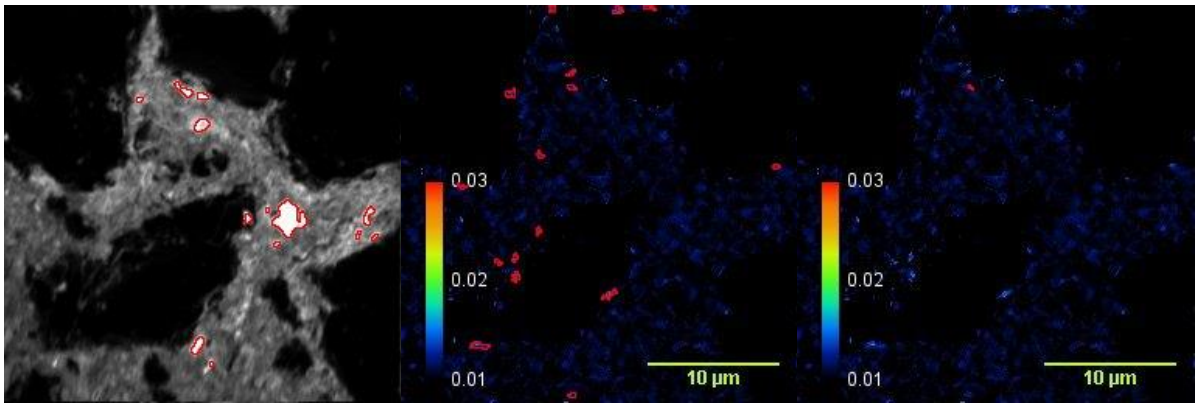


Figure 62 - Représentation du traitement permettant de corriger l'effet de charge constaté sur certaines images. (a) Image $^{12}C^{14}N$ (avec $^{12}C^{14}N$ en gris et partie minérale sans $^{12}C^{14}N$ en noir). (b) binarisation de l'image avec séparation des parties organiques en gris et minérales en rouge. (c) délimitation des zones minérales (en noir). (d) Image du ratio $^{13}C/^{12}C$ avec effet de charge visible autour de l'emplacement des minéraux (flèches rouges). (e) superposition avec les zones détectées par la binarisation préalable. (f) soustraction des zones minérales et élimination de l'effet de charge. Images de 30 µm par 30 µm.

De même, afin d'identifier les zones riches en matières organique, les images $^{12}C^{14}N$ ont été une nouvelle fois seuillées manuellement, les zones organiques correspondant aux zones présentant une valeur supérieure à 7000 (même seuil utilisé pour toutes les images) (figure 63a). Les microorganismes actifs ont été détectés par superposition des images $^{12}C^{14}N$

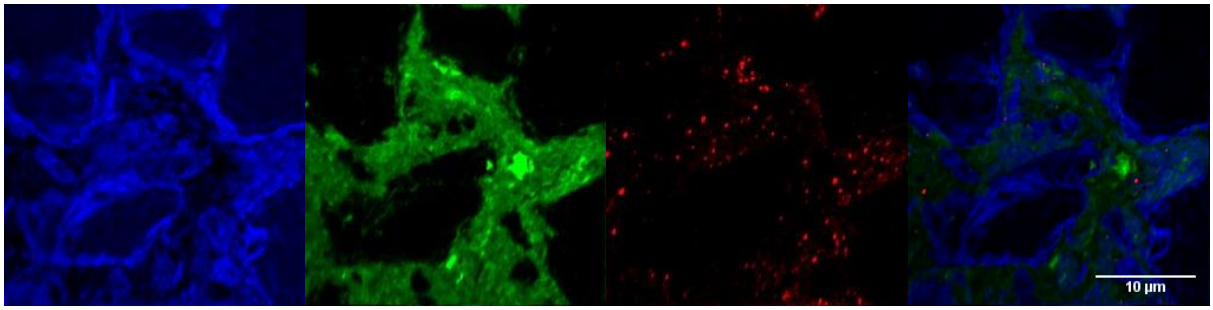
seuillées à 7000 et des zones présentant un ratio $^{13}C/^{12}C$ supérieur à 0,12 (figure 63b). Les microorganismes dégradants recherchés correspondent ainsi aux zones organiques et marquées (figure 63c).
Suite à ce traitement, une analyse du nombre et de la taille des spots détectés a été réalisée.



(a) (b) (c)

Figure 63 – Zones organiques issues de la binarisation de l'image $^{12}C^{14}N$ (a). Zones présentant un marquage $^{13}C/^{12}C$ supérieur à 0.12 (b) et zones communes aux deux ensembles représentant les zones où des microorganismes actifs sont détectés (c). Images de 30 µm par 30 µm.

Enfin des images composites des images ^{16}O, $^{12}C^{14}N$ et $^{56}Fe^{16}O$ ont été effectuées permettant d'avoir une idée de l'organisation du sol (emplacement de la matière organique, des silicates et des oxydes) aux endroits où sont détectés les microorganismes actifs (figure 64).

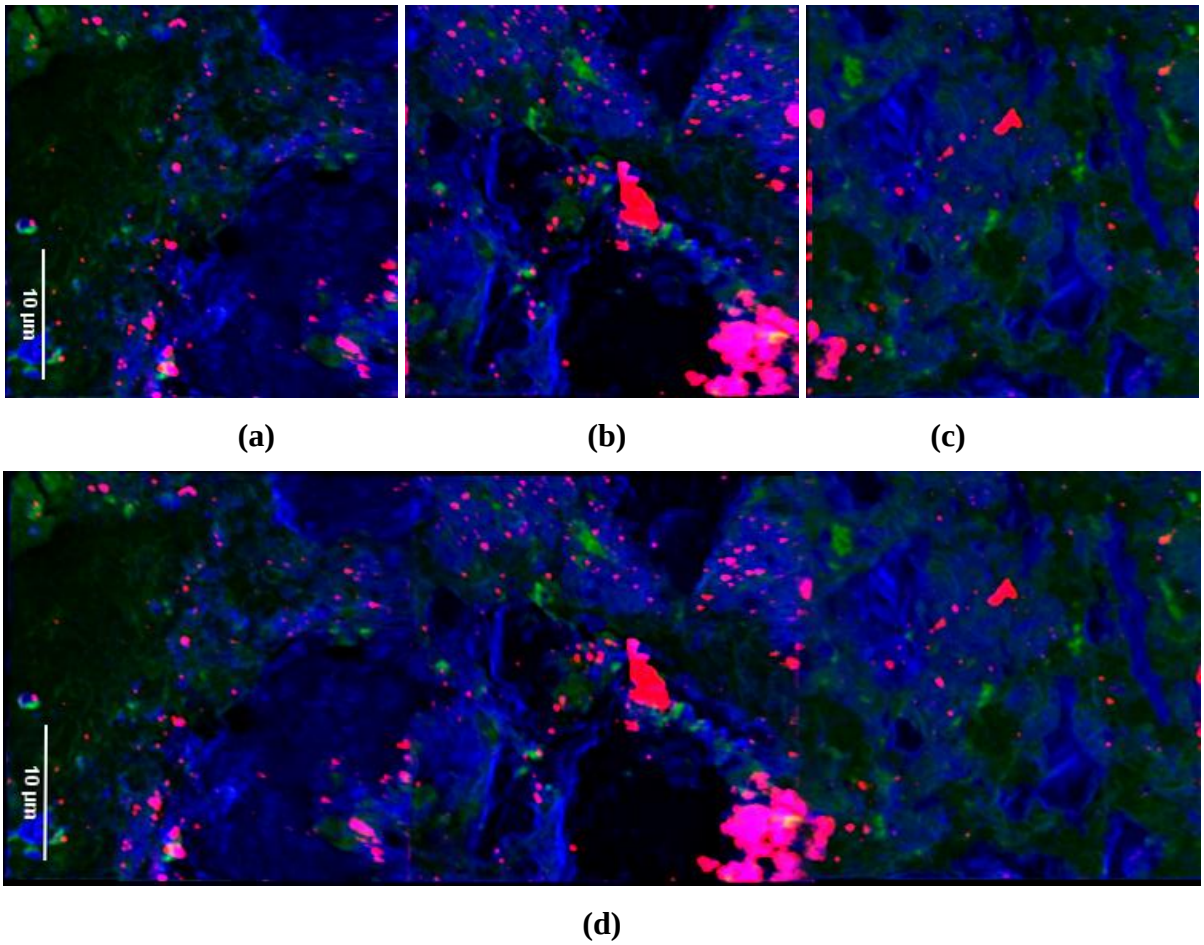


(a) (b) (c) (d)

Figure 64 - images ^{16}O (a), $^{12}C^{14}N$ (b) et $^{56}Fe^{16}O$ (c) à l'origine de l'image composite d. Images de 30 µm par 30 µm.

L'appareil ne permet d'obtenir que des plans et donc des images de 30 µm sur 30 µm.

L'analyse de zones plus grandes nécessite donc d'assembler plusieurs images en mosaïque. L'agencement des images a été réalisé par un plugin : « MosaicJ », spécialement dédié à cette tâche et chargé de réaliser une superposition semi-automatique (Thévenaz and Unser, 2007) (figure 65).



(a) **(b)** **(c)**

(d)

Figure 65 - 3 images composites des images ^{16}O (en bleu), $^{12}C^{14}N$ (en vert) et $^{56}Fe^{16}O$ (en rouge) acquises successivement par nanoSIMS (a, b et c) et assemblées grâce à MosaicJ (d). Les images a, b et c mesurent 30 µm par 30 µm et l'image d 30 µm par 90 µm.

6.2.5. Analyses statistiques

Du fait d'une distribution non normale des données (nombre de microorganismes, taille des microorganismes, distances aux pores des colonies et indice d'agrégation des colonies), un test non-paramétrique de Kruskal-Wallis ainsi qu'un test de comparaisons multiples de Dunn ont été utilisés pour traiter les données obtenues (avec un intervalle de confiance de 5%).

6.3. Résultats

6.3.1. Validation de la méthode de détection

Parmi les 12 images testées, on constate en moyenne 34±13 objets détectés par image comprenant en moyenne 10±4 faux positifs et 9±7 faux négatifs. En moyenne 24±11 objets était bien classés par la méthode. La précision producteur moyenne est de 70,3±10,5% (avec un maximum de 89,2% et un minimum de 56,7%) et la précision utilisateur moyenne est de 73,8±10,7% (avec un maximum de 89,5% et un minimum de 55,3%).

6.3.2. Distribution spatio-temporelle des microorganismes totaux selon le potentiel matriciel à échelle millimétrique

6.3.2.1. Nombre de colonies

Le nombre de "colonies" par image est compris entre 783 et 9440 avec une moyenne de 4001±1653 colonies par image. La lame mince témoin sans Calcofluor White nous a permis par soustraction du bruit de fond (3485±447 objets détectés) d'estimer la quantité de colonies moyenne dans le sol étudié à 2,9 10^7 colonies par gramme de sol avec un minimum à 0 et un maximum à 3,2 10^8±2,5 10^7. Cette estimation est rendue difficile à cause de la qualité de la lame mince ayant servi de contrôle. En effet, pour des raisons pratiques, celle-ci n'a pas pu être polie comme l'ont été les autres lames et présente des artéfacts sur sa surface venant probablement surestimer le nombre d'objets détectés (expliquant possiblement les estimations inférieures à 0 colonies). Le nombre total de microorganismes par g de sol reste néanmoins cohérent avec les valeurs classiquement observées dans les sols.

La figure 66 présente l'évolution globale du nombre de colonies en fonction du temps (figure 56a), du pF (figure 66b) et de la distance aux résidus (figure 66c). Le nombre de colonies montre des variations significatives dans le temps, entre le jour 15 (3276±823 colonies) et les jours 3 (4347±900 colonies) et 45 (4565±1838 colonies) mais aucune tendance claire ne se dégage (figure 56a). On observe une augmentation significative du nombre de colonies entre pF1,5 (3527±1143 colonies) et pF3,5 (4554±1671 colonies) (figure 66b). Enfin, aucun effet de la distance n'est observé sur le nombre de colonies (figure 66c).

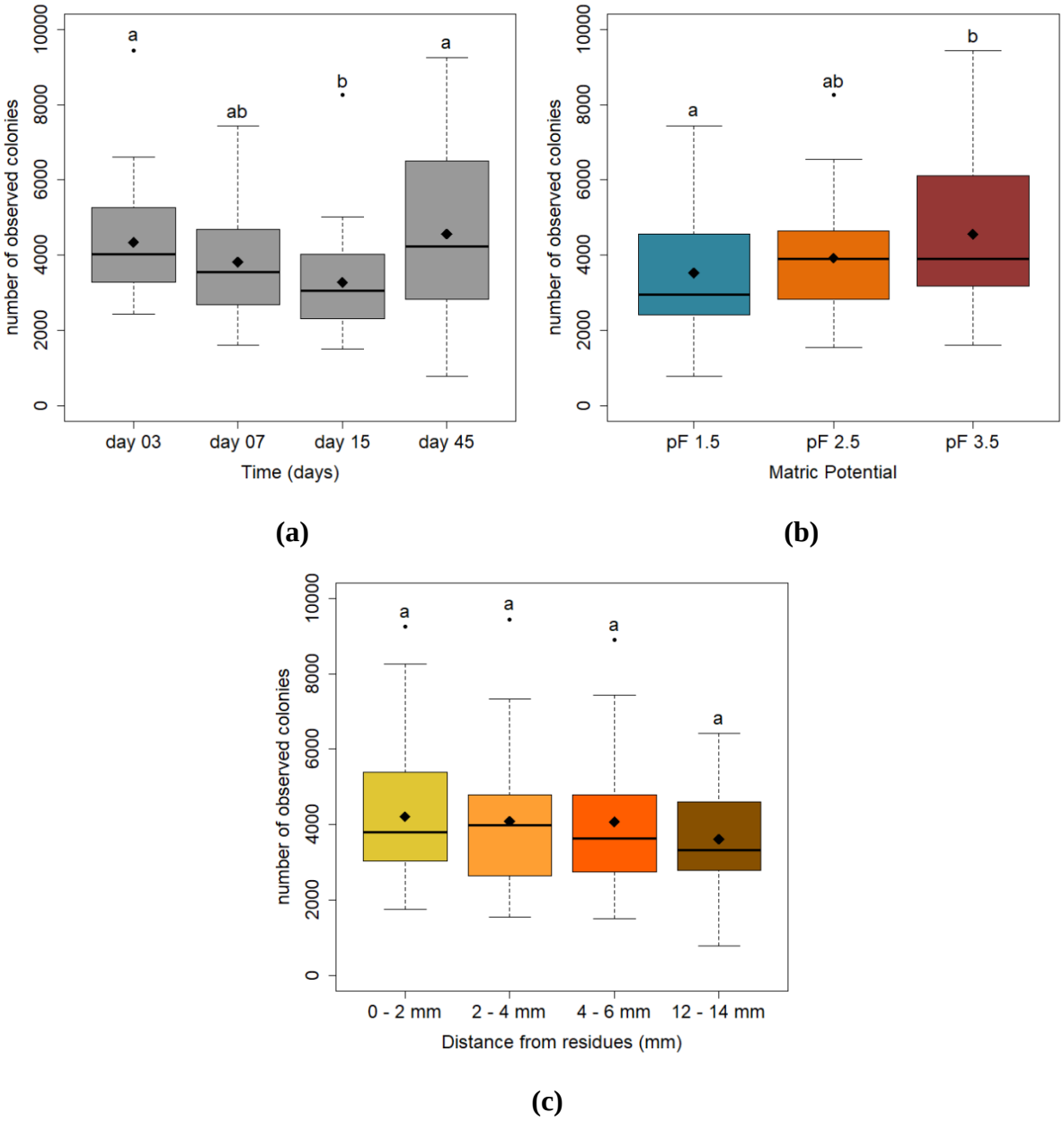
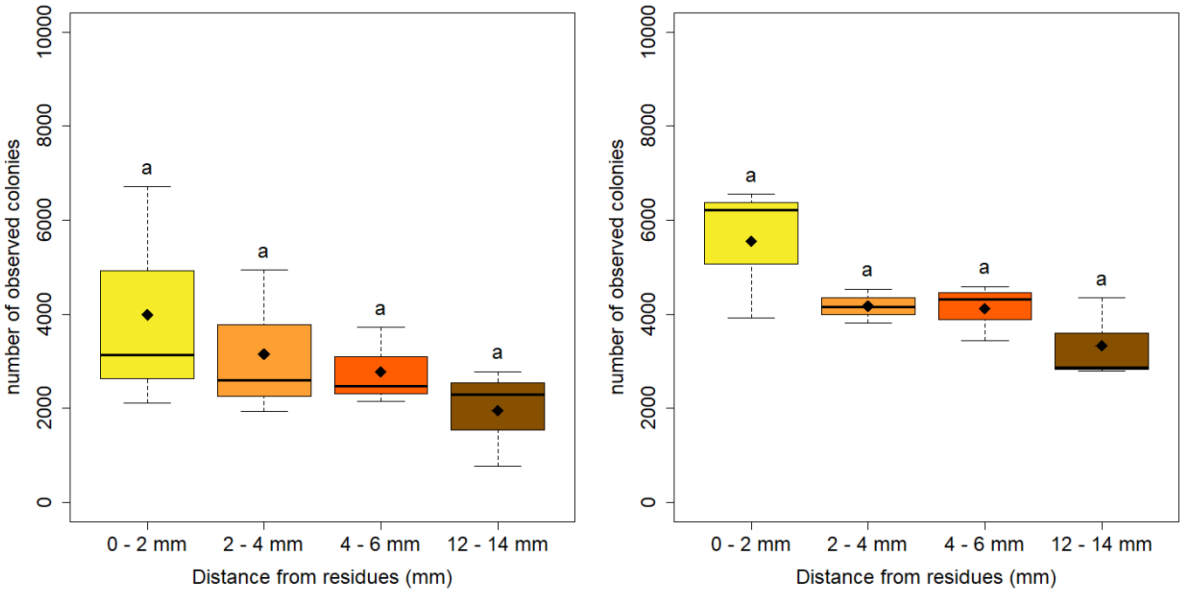
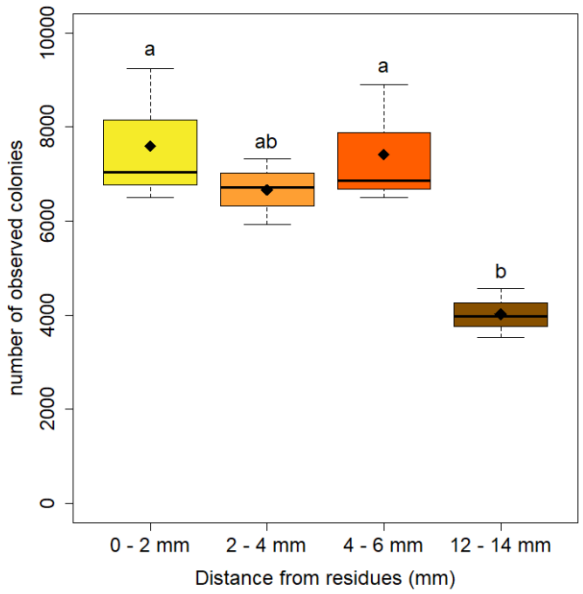


Figure 66 – Nombre de colonies tous facteurs confondus en fonction des différentes dates de prélèvement (a), des différents pF (toutes dates et distances confondues) (b) et des couches de sol situées à des distances croissantes du résidu (0-2 mm; 2-4 mm; 4-6 mm et 12-14 mm) (toutes dates et pF confondus) (c). Les losanges noirs correspondent aux moyennes et les lettres aux résultats des tests statistiques (Dunn test).

De manière générale, après 45 jours d'incubation, le nombre de colonies diminue lorsqu'on s'éloigne du lit de résidus mais les résultats ne sont significatifs qu'à pF3,5 entre les 6 premiers millimètres de sol et le sol plus éloigné (12-14 mm) (figure 67c). Toutes humidités confondues, cette différence après 45 jours, entre le sol entre 0 et 2 mm et le sol entre 12 et 14 mm est significative.



(a) **(b)**



(c)

Figure 67 - Nombre de colonies observées en microscopie à fluorescence à pF1,5 (a), pF2,5 (b) et pF3,5 (c) après 45 jours d'incubation. Les losanges noirs correspondent aux moyennes et les lettres aux résultats des tests statistiques (Dunn test).

Enfin, on observe également que l'évolution au cours du temps du nombre de colonies varie en fonction du potentiel hydrique. En effet, à pF1,5, le nombre de colonies décroit de manière significative alors que pour le pF3,5, cette valeur augmente significativement entre les jours 7 et 45 (figure 68).

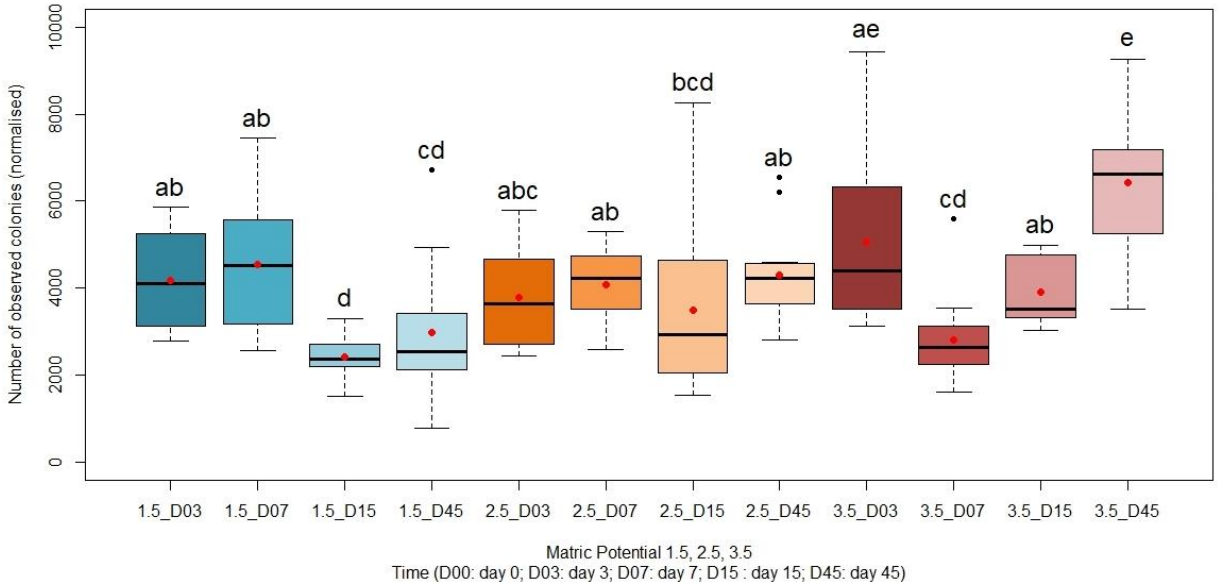
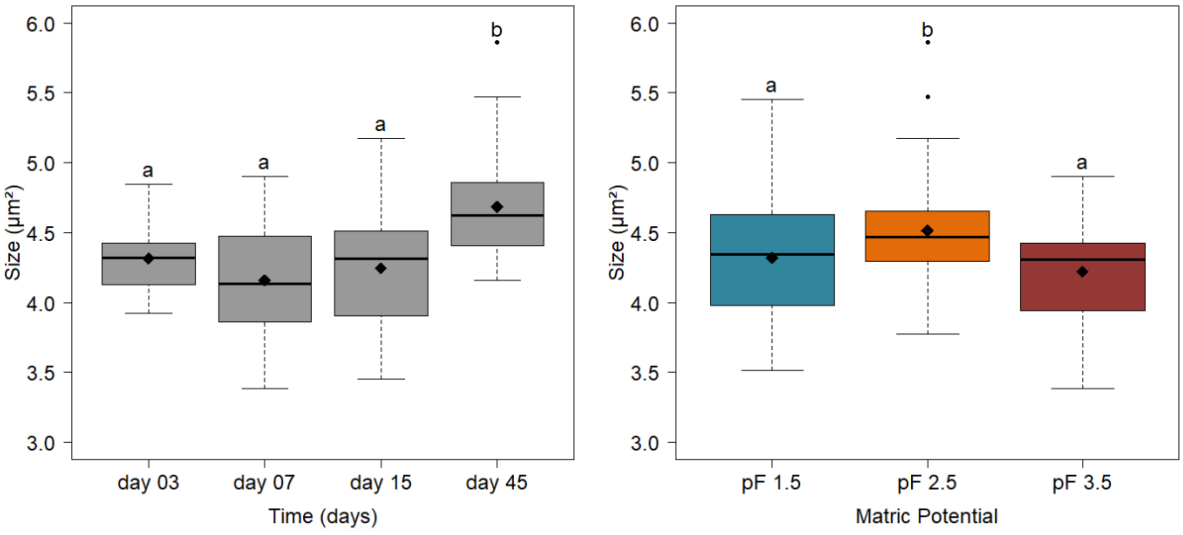


Figure 68 – Nombre des colonies observées en microscopie à fluorescence en fonction du potentiel matriciel et du temps d'incubation (toutes distances confondues). Les points rouges correspondent aux moyennes et les lettres correspondent aux résultats des tests statistiques (Dunn test).

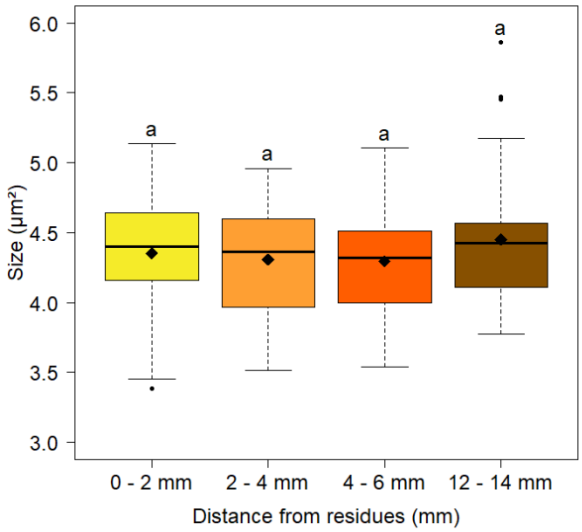
6.3.2.2. Taille des colonies

La taille moyenne des colonies varie entre 3.4 et 5.9 µm² avec une taille moyenne de 4.4±0.4 µm².

La figure 69 présente l'évolution de la taille des colonies en fonction du temps (figure 69a), du pF (figure 69b) et de la distance aux résidus (figure 69c). La taille des colonies est significativement plus élevée après 45 jours (4,7±0,3 µm²) en comparaison avec les 3 premières dates d'incubation (4,2±0,1 µm², 4,2±0,3µm² et 4,3±0,2 µm² respectivement). La taille des colonies semble également dépendante du pF et est significativement plus importante à pF2,5 (4,5±0.3 µm²) qu'à pF1,5 et 3,5 (4,3±0,4 µm² à pF1,5 et 4,2±0,2 µm² à pF3,5) (figure 69b) mais les différences restent très faibles. Enfin aucun effet de la distance n'est observé sur la taille des colonies (figure 69c).



(a) **(b)**



(c)

Figure 69 - Taille moyenne des colonies tous facteurs confondus en fonction du temps (a), du pF (toutes dates et distances confondues) (b) et de la distance aux résidus (0-2 mm; 2-4 mm; 4-6 mm et 12-14 mm) (toutes dates et pF confondus) (c). Les losanges noirs correspondent aux moyennes et les lettres aux résultats des tests statistiques (Dunn test).

Après 45 jours d'incubation, la taille des colonies est similaire quelle que soit la distance aux résidus (figure 70).

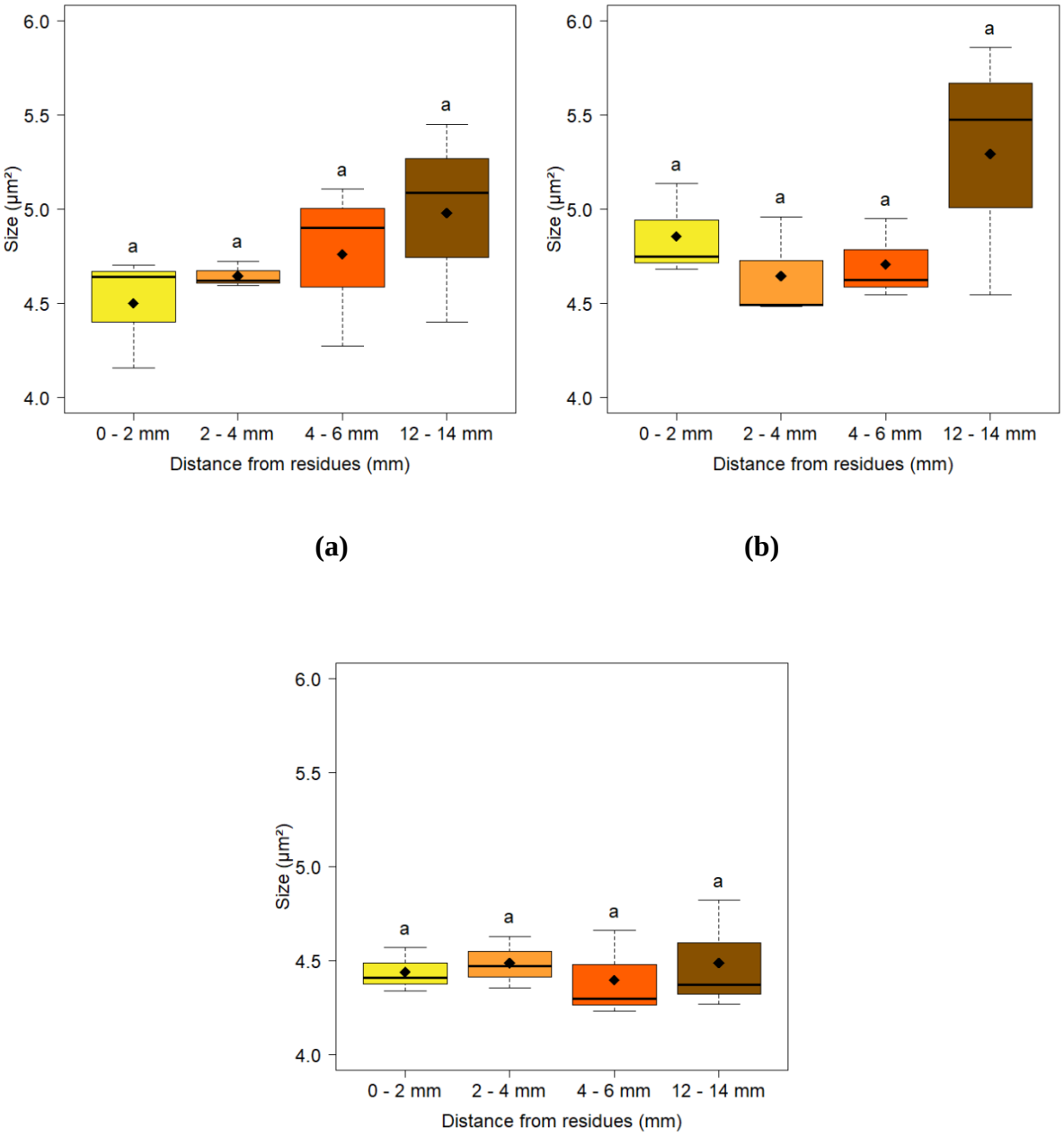


Figure 70 – Taille moyenne des colonies observées à pF1,5 (a), pF2,5 (b) et pF3,5 (c) après 45 jours d'incubation. Les losanges noirs correspondent aux moyennes et les lettres aux résultats des tests statistiques (Dunn test).

Enfin, il semblerait que, selon le pF, la taille des colonies augmente avec des différences significatives entre les jours 3 et 45 pour les pF1,5 et pF2,5 (figure 71).

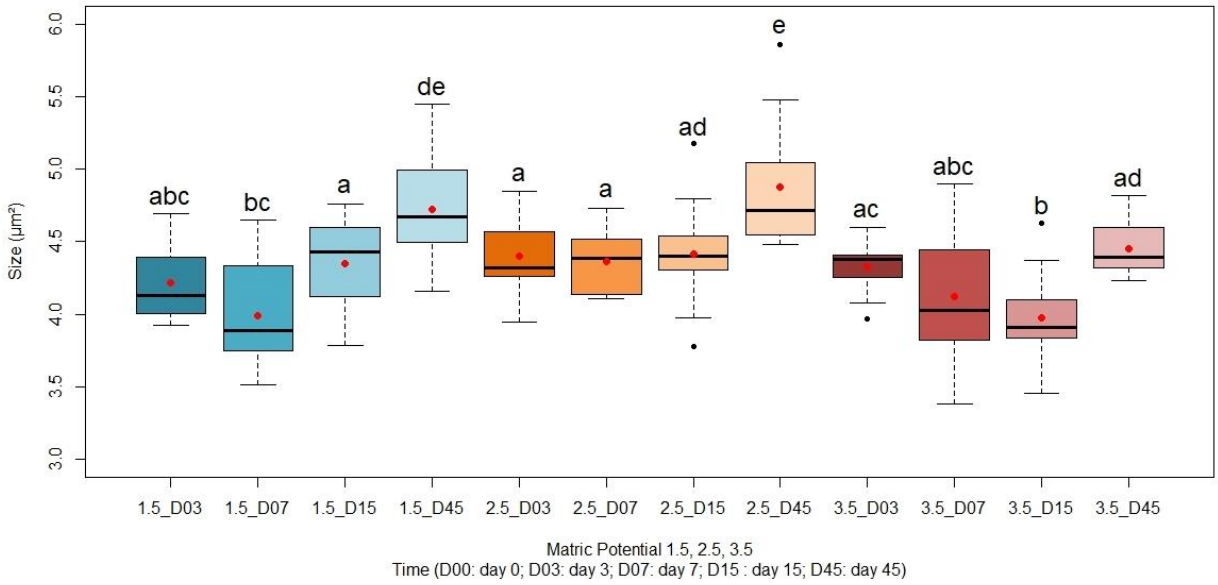


Figure 71 – Taille moyenne des colonies observées en fonction du potentiel matriciel et du temps d'incubation (toutes distances confondues). Les points rouges correspondent aux moyennes et les lettres aux résultats des tests statistiques (Dunn test).

6.3.3. Distribution spatio-temporelle des microorganismes totaux à une échelle µm

6.3.3.1. Structure agrégée vs aléatoire des colonies

L'indice d'agrégation de Ripley nous permet de constater que, si l'on considère de petites aires (des rayons r < 250 µm), la répartition des colonies est plutôt agrégée avec un ratio supérieur à 1. Si l'on considère des aires de rayon > 150 µm, les indices restent supérieurs à 1 mais ne sont plus impactés significativement par le rayon r (figure 72).

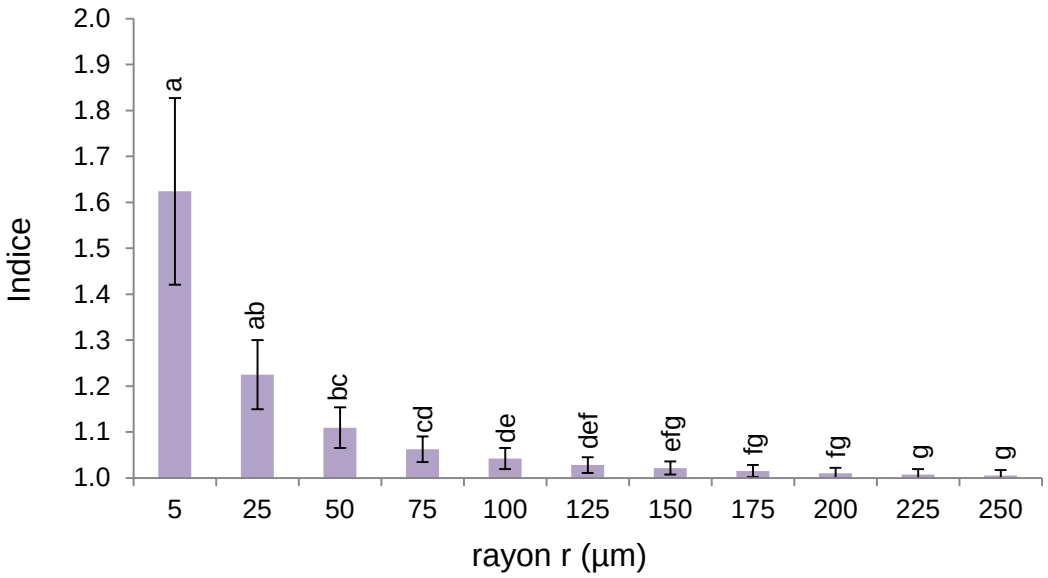


Figure 72 - Indice d'agrégation selon le rayon d'observation. Les barres correspondent à l'écart type et les lettres correspondent aux résultats des tests statistiques (Dunn test).

Les facteurs distance aux résidus pour les pF1,5 (figure 73a) et 3.5 (figure 73b), temps pour les pF1,5 (figure 73c) et pF3,5 (figure 73d) et pF tous facteurs confondus (figure 73e) n'impactent pas l'agrégation, les différences n'étant pas significatives.

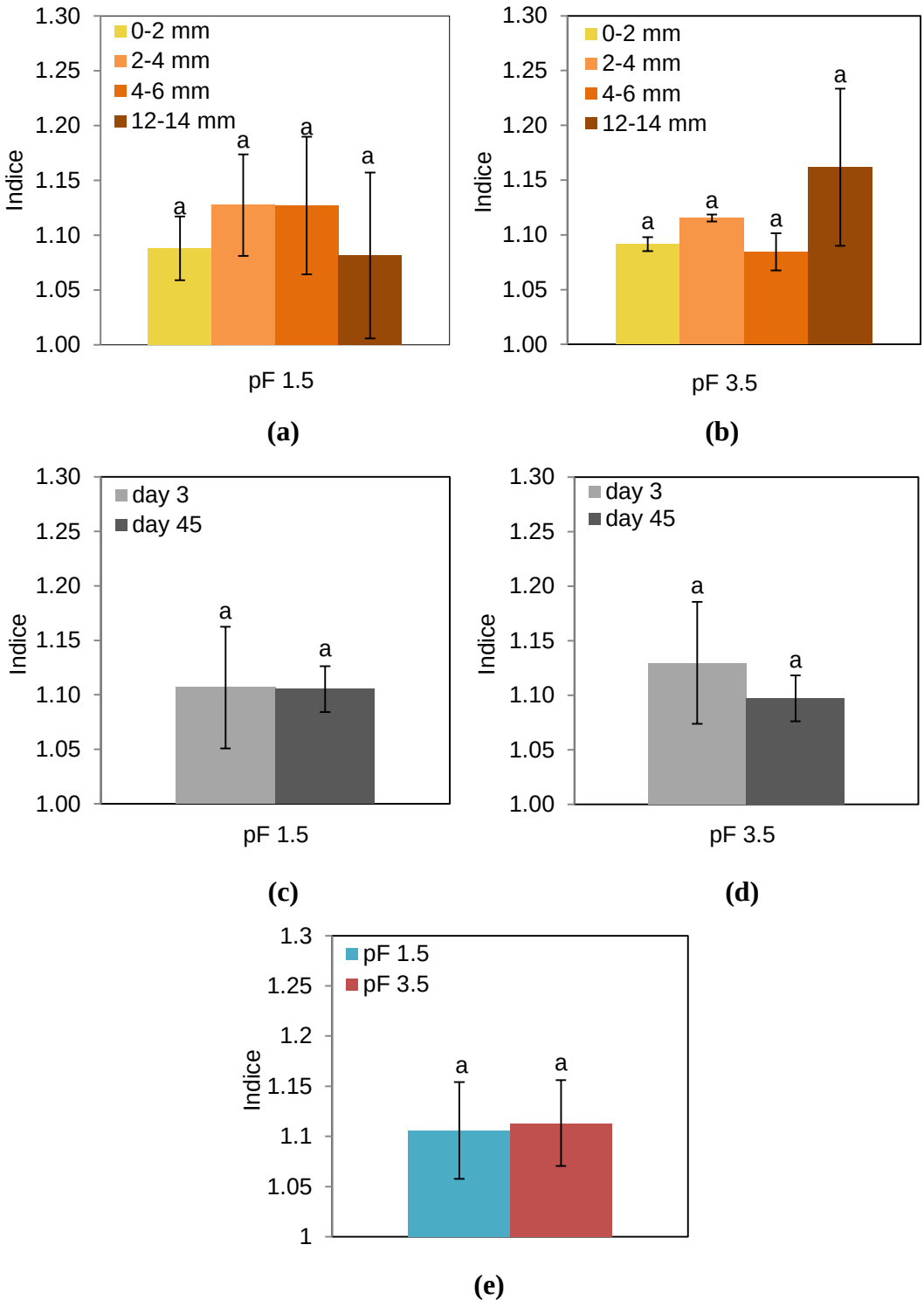


Figure 73 - Indice d'agrégation pour un rayon de 50 µm en fonction de la distance aux résidus (0-2 mm, 2-4 mm, 4-6 mm, 12-14mm) à pF1,5 (a) et pF3,5 (b), du temps d'incubation (3 et 45 jours) à pF1,5 (c) et pF3,5 (d) et du potentiel matriciel tous facteurs confondus (pF1,5 et pF3,5) (d). Les barres correspondent à l'écart type et les lettres correspondent aux résultats des tests statistiques (Dunn test).

6.3.3.2. Organisation des microorganismes autour des pores

Les pores considérés dans cette analyse (>0.05 mm^2) ont une aire moyenne de 270 998 µm² avec une circularité moyenne de 0,07. Cette valeur de circularité faible est due au fait que les pores ont une forme complexe.

L'analyse des histogrammes représentant le nombre de colonies en fonction de la distance aux pores a montré la présence d'un gradient de densité microbienne plus fort en se rapprochant des pores étudiés (avec 1,4 fois plus de colonies dans la classe de distance au macropore 0-10 µm que dans la classe de distance 10-20 µm et 1,8 fois plus de colonies dans la classe de distance 0-10 µm que dans la classe 20-30 µm) (figure 74).

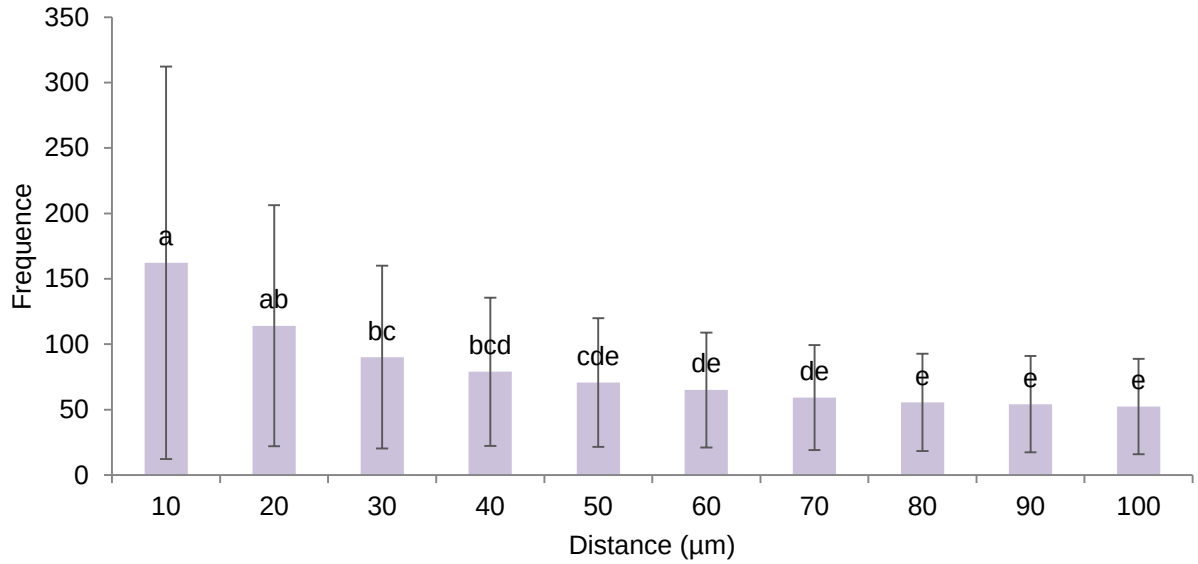


Figure 74 - Histogramme de répartition des colonies pour les pF1.5 et pF3,5 pour des classes de distribution de 10 µm. Les barres correspondent à l'écart type et les lettres aux tests statistiques (Dunn test).

Si on compare les histogrammes de répartition des colonies à pF1,5 et pF3,5, on observe un gradient légèrement plus fort à pF3,5 qu'à pF1,5, avec 1,6 fois plus de colonies dans la classe distance 0-10 µm que dans la classe de 10-20 µm à pF3,5 contre 1,4 fois plus à pF1,5 (figure 75).

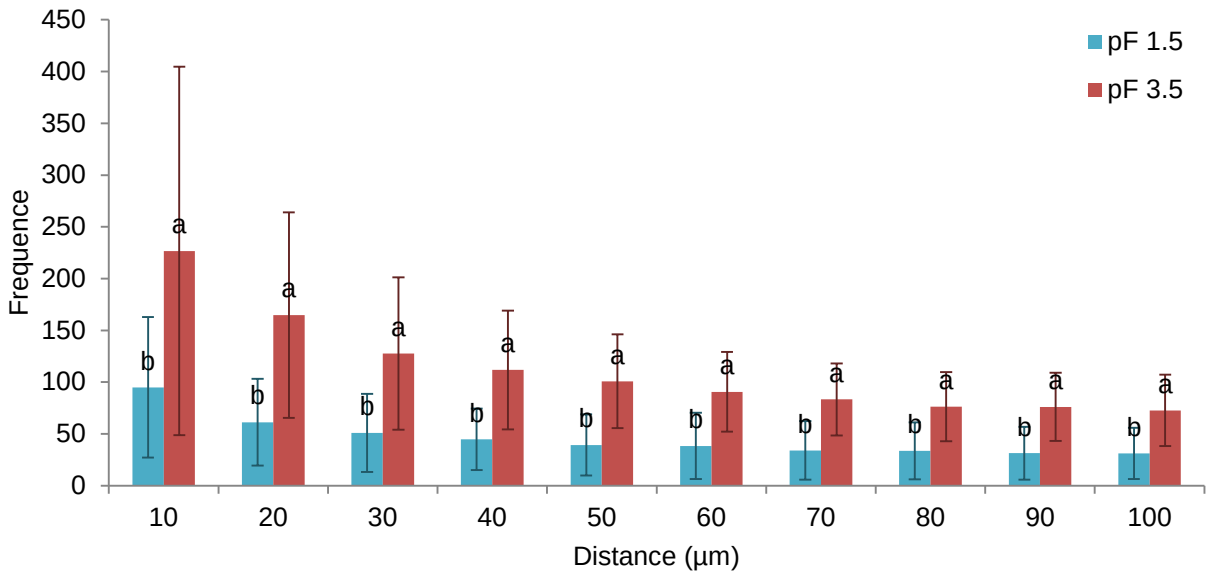


Figure 75 - Histogramme de répartition des colonies pour les pF1,5 et pF3,5 pour des classes de distribution de 10 µm. Les barres correspondent à l'écart type et les lettres aux tests statistiques entre les pF1,5 et pF3,5 pour chaque distance aux pores (Dunn test).

Si on compare les histogrammes de répartition des colonies selon la distance aux résidus, on observe des gradients plus importants entre 0 et 6 mm du résidu (avec entre 1,5 et 1,4 fois plus de colonies dans la classe de distance au macropore 0-10 µm que dans la classe 10-20 µm) qu'entre 12 et 14 mm du résidu (avec 1,2 fois plus de colonies dans la classe de distance 0-10 µm que dans la classe 10-20 µm) (figure 76). On observe le même résultat que ce soit à pF1,5 ou à pF3,5.

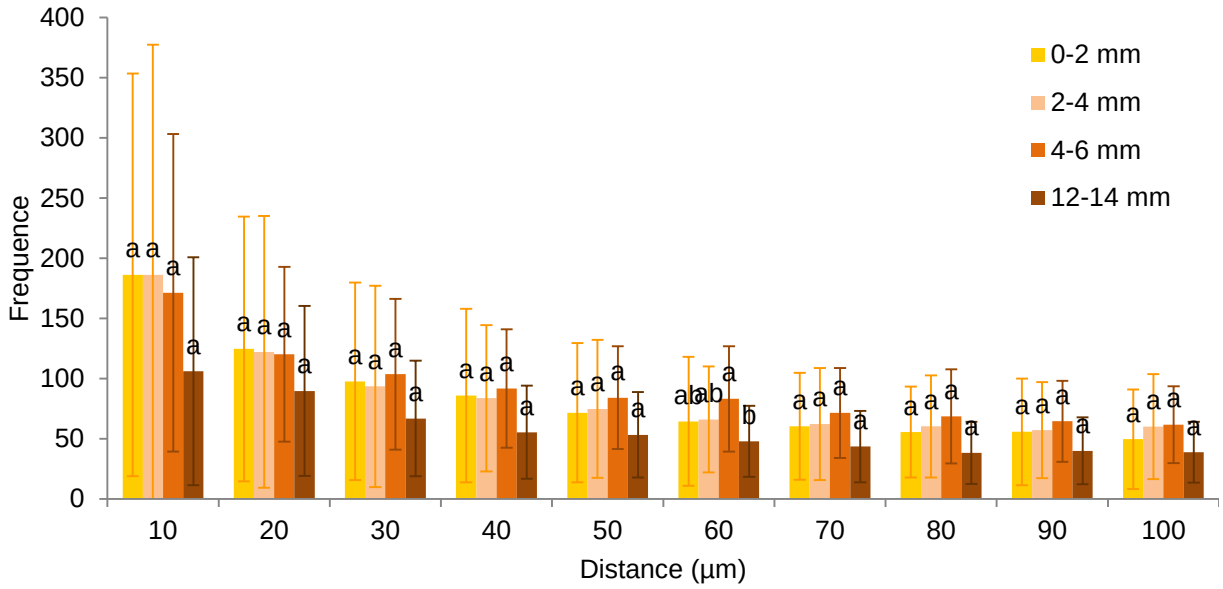
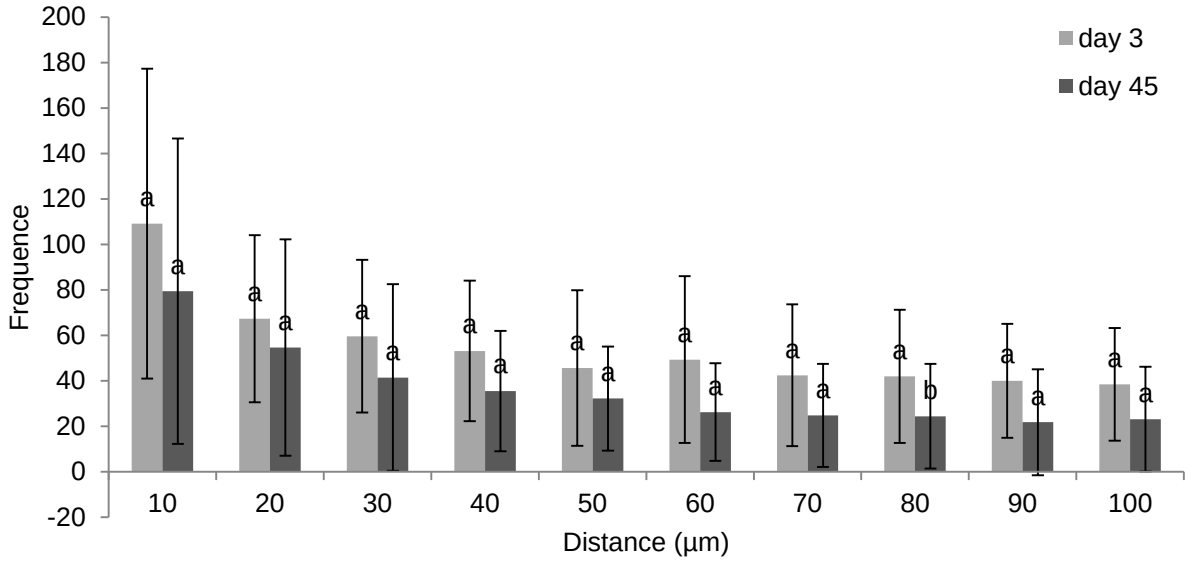
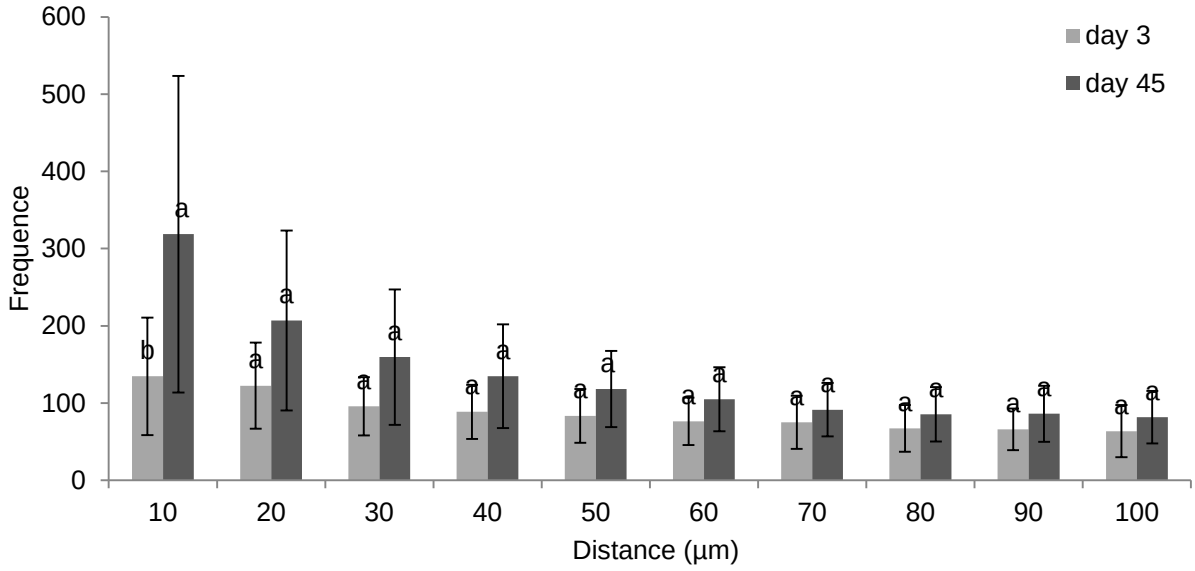


Figure 76 - Histogramme de répartition des colonies en fonction de la distance aux résidus (0-2mm, 2-4 mm, 4-6 mm et 12-14 mm) pour des classes de distribution de 10 µm. Les barres correspondent à l'écart type et les lettres aux tests statistiques entre les distances aux résidus 0-2 mm, 2-4 mm, 4-6 mm et 12-14 mm pour chaque distance aux pores (Dunn test).

Enfin, si on compare les histogrammes de répartition des colonies après 3 et 45 jours d'incubation, on observe deux résultats différents pour les pF1,5 (figure 77a) et pF3,5 (figure 77b). A pF1,5 on observe deux gradients similaires à 3 et 45 jours d'incubation (avec respectivement à jour 3 et 45, 1,6 et 1,5 fois plus de colonies dans la classe de distance 0-10 µm que dans la classe 10-20 µm). En revanche, à pF3,5 le gradient est très faible après 3 jours d'incubation (avec 1,1 fois plus de colonies dans la classe de distance au macropore 0-10 µm que dans la classe 10-20 µm) et plus important après 45 jours (avec 1.5 fois plus de colonies dans la classe 0-10 µm que dans la classe 10-20 µm).



(a)



(b)

Figure 77 - Histogramme de répartition des colonies après 3 et 45 jours d'incubation pour des classes de distribution de 10 µm à pF1,5 (a) et à pF3,5 (b). Les barres correspondent à l'écart type et les lettres aux tests statistiques entre les jours 3 et 45 pour chaque distance aux pores (Dunn test).

6.3.4. Distribution spatio-temporelle des microorganismes actifs à une échelle µm

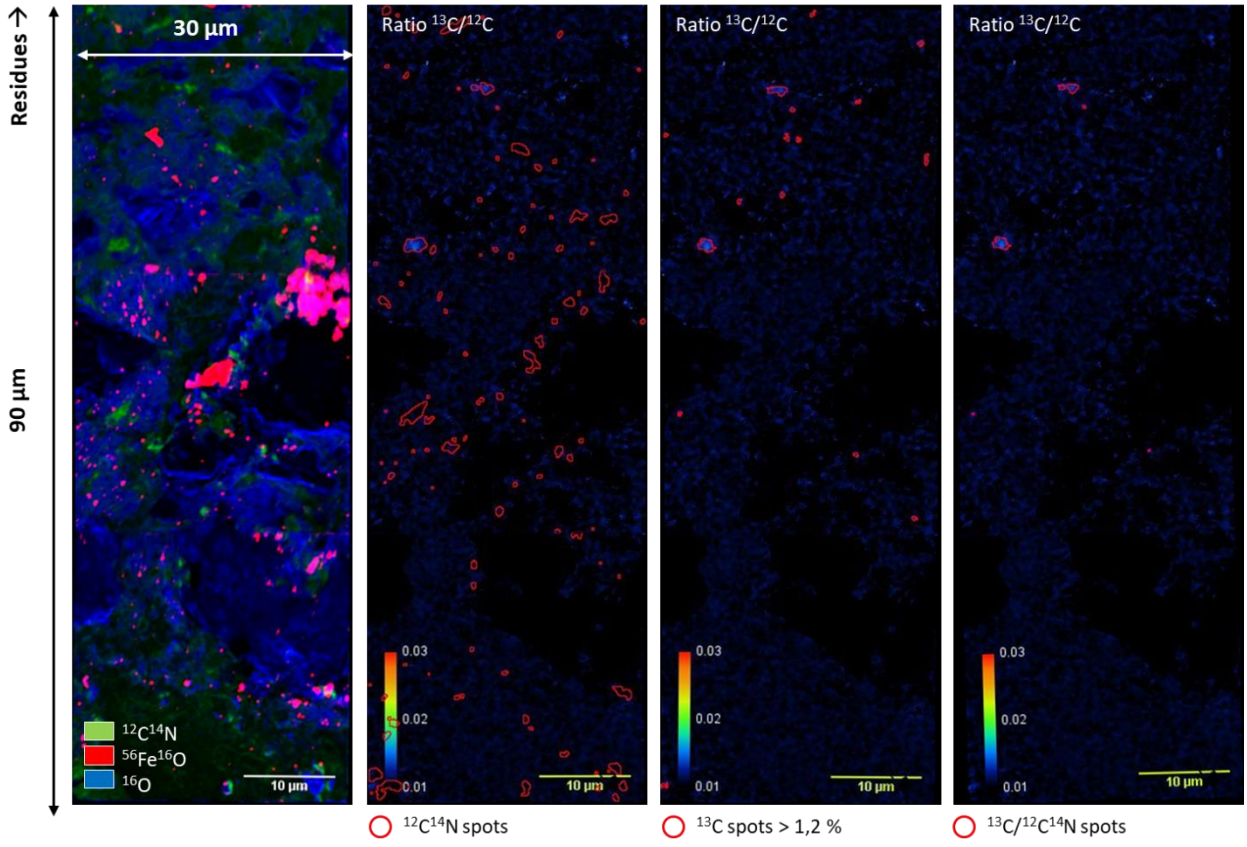
A pF1,5 et après 7 jours d'incubation, on observe la présence de marquage dans les parties du sol analysées qui sont au contact des résidus. On observe cependant une forte variabilité du

marquage d'une image à une autre (figures 78d, 78h et 78l) d'une part et au sein d'une image donnée d'autre part avec des zones dépourvues de marquage et des zones marquées en ^{13}C. On observe notamment un petit morceau de résidu qui a migré depuis la grille vers le sol sur une des images (figure 78h). On a détecté entre 0 et 57 spots de ^{13}C dans les images, avec en moyenne 16±19 spots par image (médiane=8). Les spots détectés avaient une aire comprise entre 0,14 µm² et 0,73 µm² avec une moyenne de 0,37±0,25 µm², bien en deçà de la taille des colonies détectées en fluorescence, mais les résolutions ne sont pas les mêmes par ailleurs.

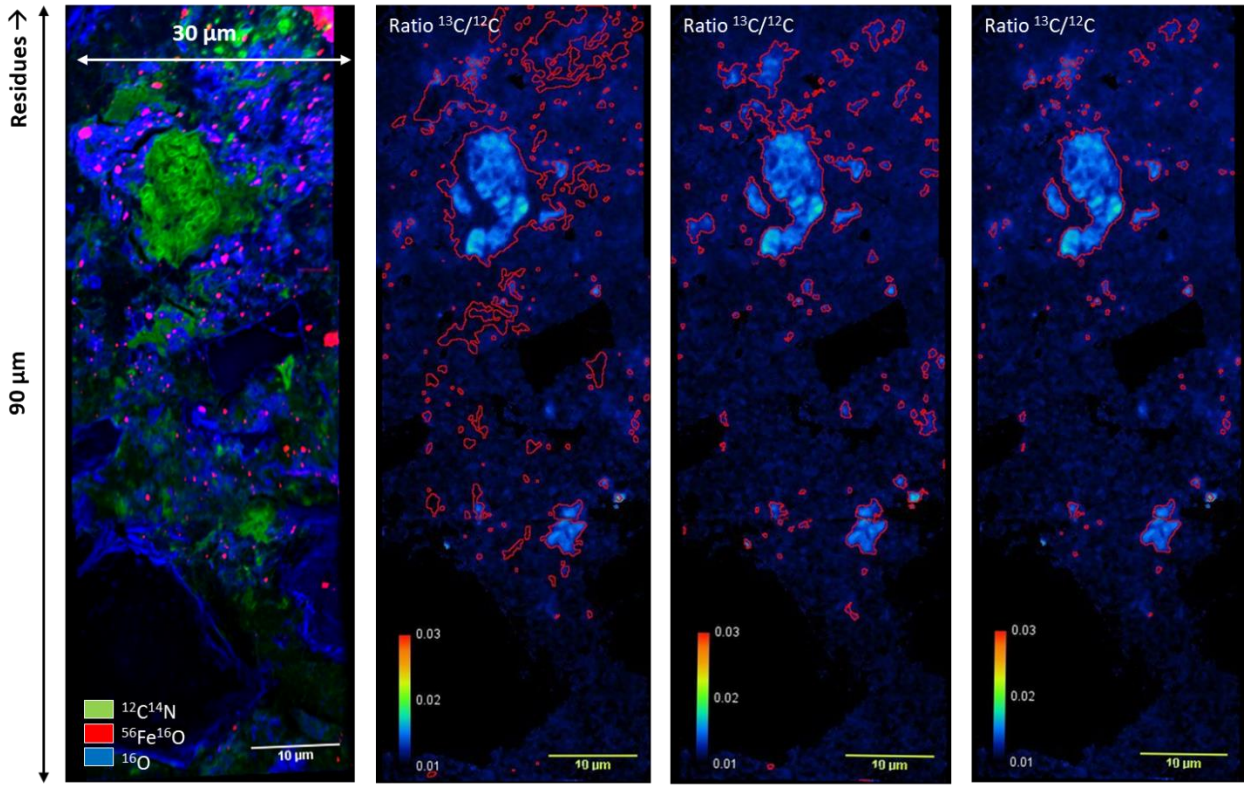
A la même humidité mais après 45 jours d'incubation, les images acquises en nanoSIMS au contact du résidu ne montrent pas ou presque pas de marquage (figures 79d et 79h). Aucun marquage n'a été détecté dans le sol à distance des résidus.
A pF3,5 après 45 jours d'incubation, nous n'avons pas non plus retrouvé de marquage ou très peu au contact du résidu (figures 80d et 80h).
Pour l'ensemble des échantillons observés, et bien que le nombre d'images analysées soit moins important, aucun marquage n'a été détecté à distance des résidus (tableau 9).

Tableau 9 - Récapitulatif des images réalisées en nanoSIMS avec mention du marquage observé.

modalités	Zones acquises	Nombre d'images	Nombre d'images avec marquage
pF1,5 jour 7	Dans le résidu (vérification du marquage)	1 (non présentée)	1/1
	Au contact du résidu (0 mm)	10 dont 9 ayant servi pour réaliser 3 mosaïques de 90 µm (dont 1 non présentée)	10/10
pF1,5 jour 45	A proximité du résidu (0,05 et 0,5 mm)	2	1/2
	A distance du résidu (? mm)	1 (non présentée)	0/1
pF3,5 jour 45	Au contact et à proximité du résidu (0 ; 0,4 ; 0,5 et 1 mm)	4 (dont 2 non présentées)	¼ (0 mm)
	A distance du résidu (17 mm) (près d'un hyphe)	1 (non présentée)	0/1


Residues
90 µm
30 µm
$^{12}C^{14}N$
$^{56}Fe^{16}O$
^{16}O
10 µm
Ratio $^{13}C/^{12}C$
0.03
0.02
0.01
$^{12}C^{14}N$ spots
^{13}C spots > 1,2 %
$^{13}C/^{12}C^{14}N$ spots

. **(a)** **(b)** **(c)** **(d)**


Residues
90 µm
30 µm
$^{12}C^{14}N$
$^{56}Fe^{16}O$
^{16}O
10 µm
Ratio $^{13}C/^{12}C$
0.03
0.02
0.01
$^{12}C^{14}N$ spots
^{13}C spots > 1,2 %
$^{13}C \cap {}^{12}C^{14}N$ spots

(e) **(f)** **(g)** **(h)**

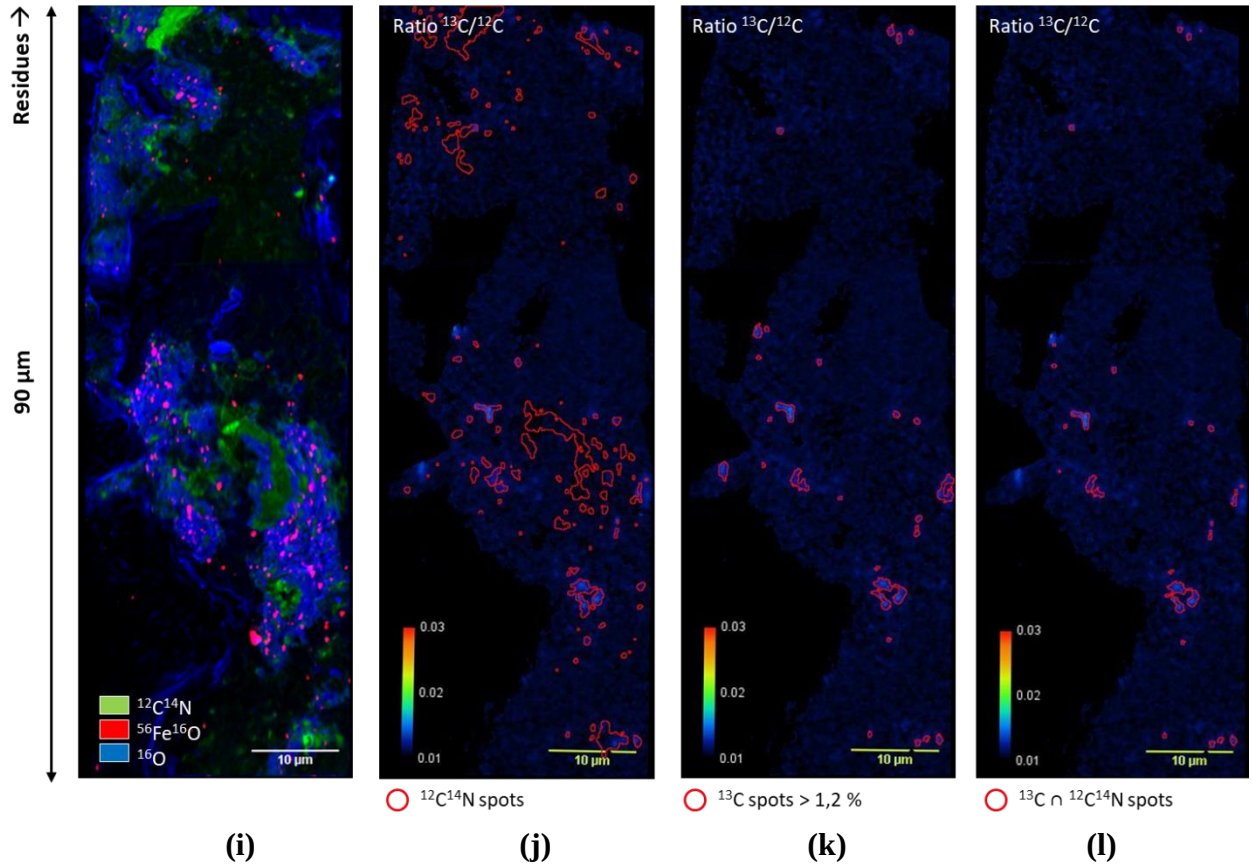


Figure 78 - Mosaïques d'images acquises par NanoSIMS des échantillons à pF1,5 au contact du résidu après 7 jours d'incubation. Images composites des éléments $^{12}C^{14}N$, $^{56}Fe^{16}O$ et ^{16}O (a, e, i). Projection des zones riches en $^{12}C^{14}N$ sur les images du Ratio $^{13}C/^{12}C$ (b, f, j). Projection des zones marquées ^{13}C à hauteur de 1.2% sur les images du Ratio $^{13}C/^{12}C$ (c, g, k). Projection des zones comprenant à la fois des zones riches en $^{12}C^{14}N$ et marquées ^{13}C à hauteur de 1.2% sur les images du ratio $^{13}C/^{12}C$ (d, h, l).

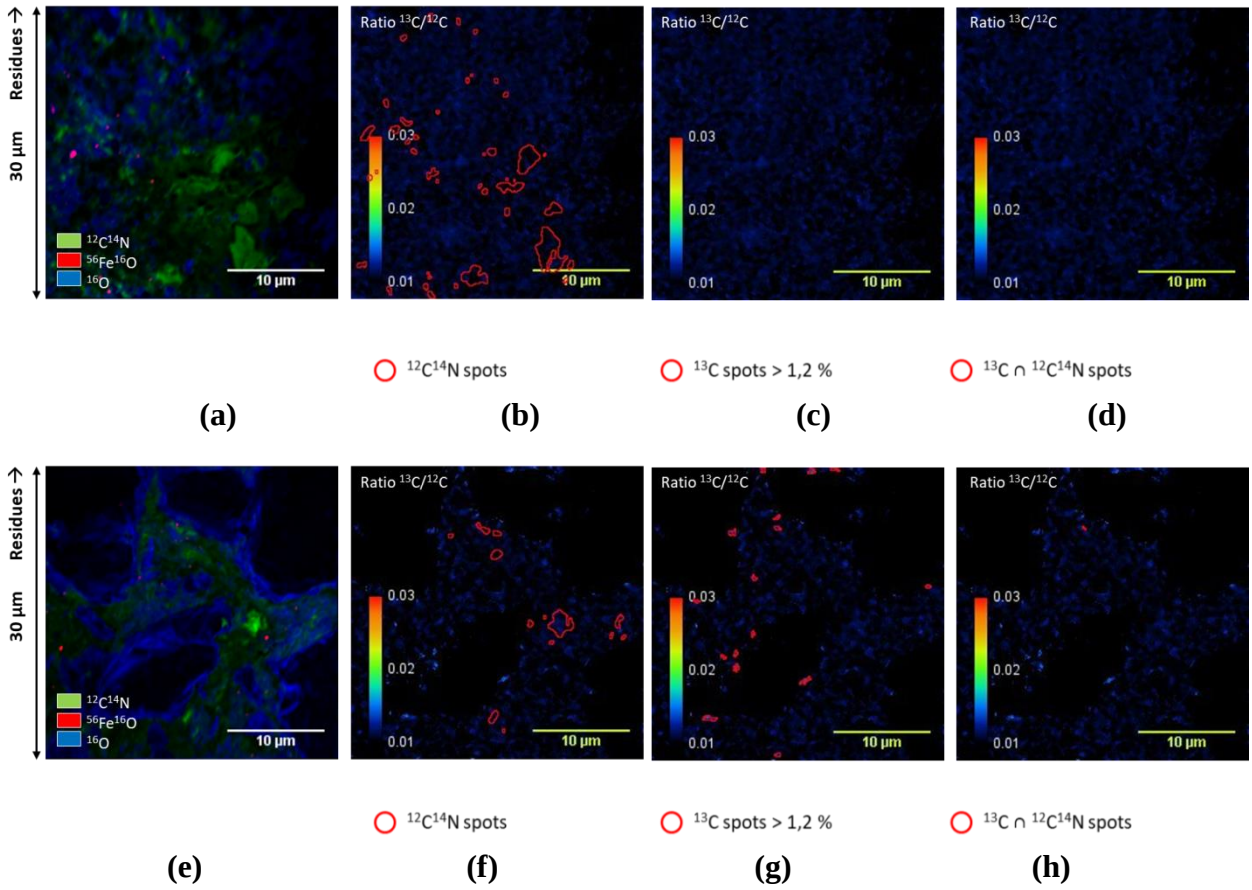


Figure 79 - Images acquises par NanoSIMS des échantillons à pF1,5 au contact du résidu après 45 jours d'incubation. Images composites des éléments $^{12}C^{14}N$, $^{56}Fe^{16}O$ et ^{16}O (a,e). Projection des zones riches en $^{12}C^{14}N$ sur les images du Ratio $^{13}C/^{12}C$ (b, f). Projection des zones marquées ^{13}C à hauteur de 1.2% sur les images du Ratio $^{13}C/^{12}C$ (c, g). Projection des zones comprenant à la fois des zones riches en $^{12}C^{14}N$ et marquées ^{13}C à hauteur de 1.2% sur les images du ratio $^{13}C/^{12}C$ (d, h).

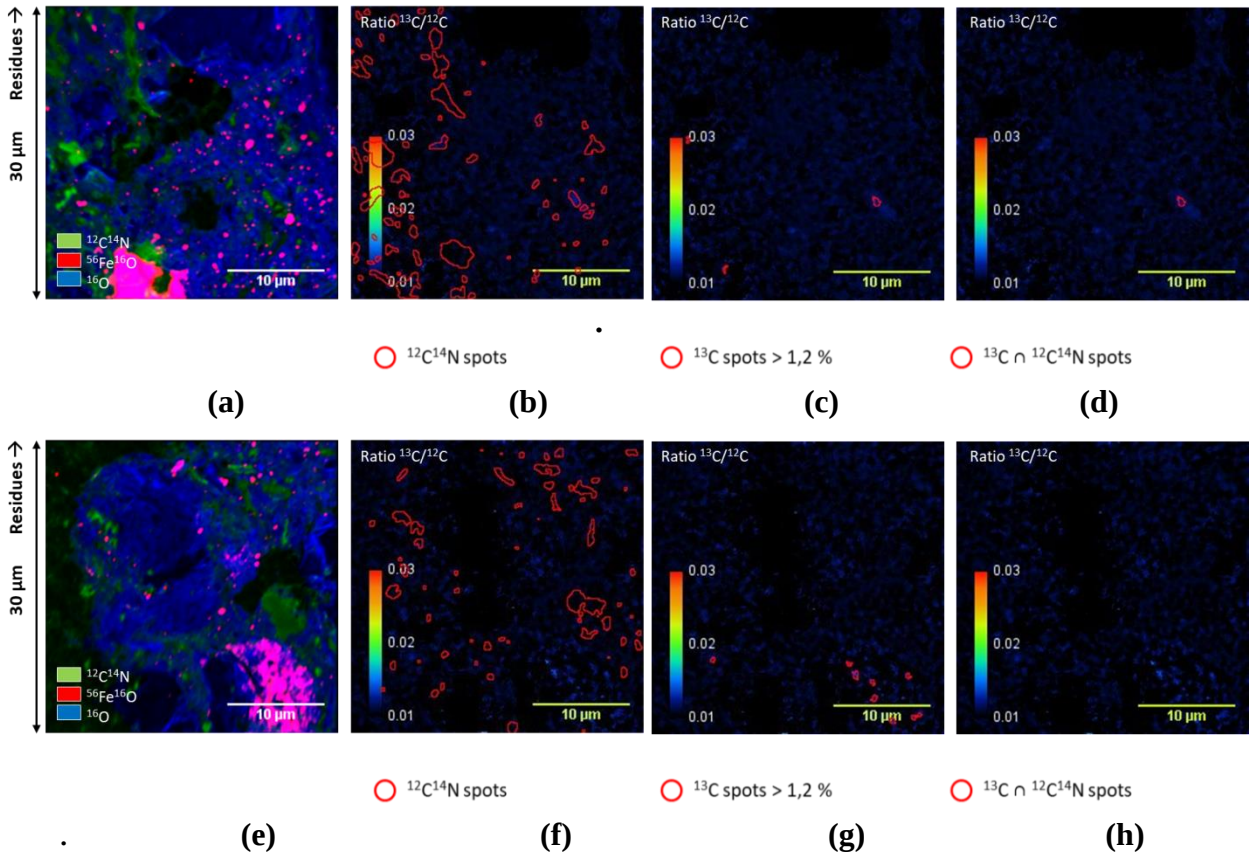


Figure 80 - Images acquises par NanoSIMS des échantillons à pF3,5 au contact du résidu après 45 jours d'incubation. Images composites des éléments $^{12}C^{14}N$, $^{56}Fe^{16}O$ et ^{16}O (a,e). Projection des zones riches en $^{12}C^{14}N$ sur les images du Ratio $^{13}C/^{12}C$ (b, f). Projection des zones marquées ^{13}C à hauteur de 1.2% sur les images du Ratio $^{13}C/^{12}C$ (c, g). Projection des zones comprenant à la fois des zones riches en $^{12}C^{14}N$ et marquées ^{13}C à hauteur de 1.2% sur les images du ratio $^{13}C/^{12}C$ (d, h).

6.4 Discussion

6.4.1. Limites méthodologiques

6.4.1.1. Microscopie à fluorescence et traitement d'image

La microscopie à fluorescence, telle qu'elle a été utilisée dans cette étude, présente un certain nombre de limites. Certaines sont inhérentes à la technique alors que d'autres pourraient être corrigées pour des études ultérieures.

Tout d'abord, il serait préférable de réaliser des répétitions des lames témoins (auto-fluorescence du sol) et de les polir dans les mêmes conditions que les autres lames comme cela a déjà été souligné.

De plus, les acquisitions permettent difficilement dans certains cas de distinguer les microorganismes les uns des autres. Ce biais peut être dû soit à une résolution insuffisante ne faisant apparaitre qu'un point alors que plusieurs microorganismes sont présents, soit au traitement de l'image qui ne distingue pas bien deux objets presque collés et ne prend en compte qu'un objet voire aucun si cela affecte la circularité de l'objet. Il est donc possible que le nombre de microorganismes ait parfois été sous-estimé. Néanmoins ce biais est supposé être le même pour toutes les lames acquises, traitées dans les mêmes conditions, et n'empêche donc pas la comparaison des traitements. La résolution pourrait être améliorée dans des acquisitions futures avec d'autres optiques. La discrimination des objets aurait également pu être améliorée par l'acquisition d'images couleurs et non pas en noir et blanc comme cela a été préféré par Nunan et al. (2001**)**.

La méthode de détection des colonies montre qu'une majeure partie des colonies sont correctement détectées mais que 30% des objets étant considérés manuellement comme étant des colonies ont pu être malgré tout écartés par la méthode de détection. Ils correspondent souvent à des colonies de petite taille et dont le contraste peu important peut expliquer que la méthode de détection ne les a pas reconnues comme des colonies. Par ailleurs, moins de 30% des objets détectés correspondent à des objets n'étant pas des colonies mais d'autres types d'objets (petits minéraux très clairs, auto-fluorescents…).
Bien que la méthode de détection ne permette pas d'effectuer une quantification absolue du nombre de microorganismes dans le sol, celle-ci reste suffisamment efficace pour comparer nos images entre elles étant données qu'elles sont toutes issues du même protocole et que leur qualité est équivalente.
Par ailleurs, le traitement des images mis en place n'est pas, non plus, bien adapté à la détection des champignons qui, de par leurs hyphes, peuvent présenter des structures allongées de surface importante et qui sont ici écartées puisque les microorganismes ont été détectés sur des critères de taille et de circularité. Seuls ceux en coupe parfaitement perpendiculaires au plan ont pu être pris en compte. Ce biais peut avoir des conséquences importantes pour comparer les 2 potentiels hydriques qui peuvent plus ou moins favoriser les champignons (cf chapitre 3). L'utilisation de deux marqueurs permettant de distinguer plus

précisément les microorganismes comme le FISH (fluorescence in situ hybridization) aurait pu être un plus pour ce type d'acquisitions (Schmidt et Eickhorst, 2014).
A une échelle µm, les distances aux macropores considérées sont des distances Euclidiennes et ne prennent donc pas en compte l'organisation en trois dimensions du réseau poral qui joue un rôle majeur dans l'accessibilité (Raynaud et Nunan, 2014; Baveye et al., 2018).
Par ailleurs, dans ce chapitre, nous avons autant que possible essayé de limiter l'impact « utilisateur » (Baveye et al., 2010; Houston et al., 2013; Baveye et al., 2018) pour les traitements d'images en choisissant autant que possible d'utiliser des méthodes automatiques ou à défaut des seuils uniques à toutes les images, ceci étant possible dans la mesure où les échantillons sont de même nature, préparés et acquis de la même façon.

6.4.1.2. NanoSIMS

La visualisation dans le sol de microorganismes ayant incorporé le carbone ^{13}C du résidu a été difficile à mener avec la nanoSIMS en raison d'un faible marquage dans le sol et ce, malgré le fort marquage du résidu utilisé. Ainsi, nous n'avons pas pu détecter de microorganismes dégradants dans le sol à distance des résidus alors que nous avions pu quantifier du ^{13}C présent dans le sol après avoir diffusé depuis les résidus et quantifié des microorganismes dégradants via les ^{13}C-PLFA (cf Chapitre 3). Ces résultats peuvent également être dus au trop faible nombre d'analyses. De plus, les zones à analyser ont été sélectionnées sur la base de la microcopie à fluorescence mais peuvent conduire à un échec même si des microorganismes sont présents car la profondeur de champ des 2 méthodes est différente (quelques µm pour la microscopie à fluorescence et seulement quelques nm pour la nanoSIMS).

Par ailleurs, la nanoSIMS est une technique extrêmement chronophage, coûteuse et compliquée à mettre en place, ce qui limite le nombre d'acquisitions et d'échantillons analysés. Or la surface analysée, de quelques micromètres carrés seulement, nécessite un grand nombre d'acquisitions pour pouvoir être représentatif et tirer des conclusions. L'étude de l'évolution spatio-temporelle des microorganismes dégradants dans le sol (et non à la surface de résidus végétaux comme réalisé par ailleurs (Vidal et al., 2018) reste donc encore difficile avec cette méthode pour le moment.

Bien que le protocole mis en place nous ait permis de fabriquer des lames minces utilisables à la fois pour la microscopie à fluorescence et la nanoSIMS, il reste difficile de combiner les résultats des 2 méthodes car il est difficile de géo-localiser les zones cartographiées (ce qui empêche la superposition des images).
Par ailleurs, un ensemble de techniques d'acquisition en fluorescence n'ont pas pu être testées car nécessitant l'emploi d'huile d'immersion à fort grossissement pouvant contaminer les échantillons pour une utilisation ultérieure en nanoSIMS. Enfin, une fois les acquisitions en nanoSIMS réalisées, il n'a pas non plus été possible de revenir vers la microscopie à fluorescence puisque les échantillons ont été recouverts d'or. La compatibilité entre ces deux méthodes d'observation est donc limitée, contrairement à ce que nous anticipions.

6.4.2. Distribution spatiale des microorganismes totaux à une échelle mm

Le nombre de microorganismes détectés en microscopie à fluorescence et la taille des colonies ne varient pas en fonction de la distance aux résidus. Des tendances apparaissent après 45 jours avec une plus forte quantité de microorganismes dans la zone 0-2 mm mais les différences ne sont significatives qu'à pF3,5. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus dans le chapitre 3 où nous avions observé, en quantifiant les PLFA, davantage de microorganismes à proximité des résidus que dans le sol plus distant et ce, dès 3 jours. Ces différences de résultats peuvent être dues aux méthodes utilisées. En effet, les quantités de sol analysées sont beaucoup plus faibles en microscopie à fluorescence qu'avec les PLFA et du fait de la distribution spatiale hétérogène des microorganismes dans le sol, la variabilité entre répétitions est donc beaucoup plus importante en microscopie à fluorescence et pourrait être supérieure à l'effet distribution spatiale. De plus, le Calcofluor White qui se lie aux polysaccharides, peut marquer des microorganismes morts (Nunan et al., 2002) alors que les PLFA permettent de quantifier les microorganismes viables et actifs ou dans les heures qui suivent la mort cellulaire (Zhang et al., 2019). D'autres travaux qui ont utilisé des méthodes de microscopie ont néanmoins observé des résultats contraires. Ainsi Schlüter et al. (2019), dans une étude en microcosmes avec un apport localisé de fragments de feuilles de peuplier, ont montré qu'après 7 jours, les bactéries étaient plus nombreuses à proximité des résidus végétaux que dans le sol plus distant (microscopie à fluorescence). De même, Gaillard et al. (1999) ont mis en évidence un fort gradient de colonisation microbienne des résidus de paille vers le sol à l'échelle de quelques mm après 30 jours d'incubation par microscopie

électronique à balayage à basse température. Les résultats en microscopie à fluorescence et *via* les PLFA sont en revanche davantage cohérents si on considère l'effet pF avec plus de microorganismes totaux à pF3,5 qu'à pF1,5 ou pF2,5. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait qu'à pF1,5, dans un sol plus humide, la dégradation des résidus est plus importante et rapide, conduisant à un épuisement des ressources, une stimulation mais également une décroissance de l'abondance des microorganismes plus rapide. De plus, les phénomènes de compétition et de prédation peuvent également être davantage favorisés à pF1,5 qu'à pF3,5, des pores jusqu'à 100 µm de diamètre étant remplis d'eau (1 µm à pF3,5) (Ranjard et Richaume, 2001; Treves et al., 2003). Enfin, si on n'observe peu d'évolution du nombre de colonies en fonction du temps (résultats similaires aux PLFA), il semble néanmoins que la taille des colonies augmente légèrement, et notamment après 45 jours. Ainsi, un apport de substrat pourrait davantage stimuler les mêmes colonies au cours du temps *via* des voies de transfert préférentielles plutôt que de stimuler de nouvelles colonies *via* la diffusion vers d'autres microenvironnements.

6.4.3. Distribution spatiale des microorganismes totaux à une échelle µm

Les résultats de cette étude ont montré que les microorganismes avaient plutôt une structure agrégée et n'étaient pas distribués de manière homogène dans le sol. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Grundmann et al. (2001) et Nunan et al. (2002, 2003). Nous avons également montré que l'agrégation ne variait pas en fonction du temps ou du pF. Dechesne et al. (2010**)** avaient montré que la dispersion de microorganismes pouvait être stimulée dans les sols très humides, mais leur étude a été conduite dans une matrice de sable favorisant la connectivité et les transferts et dans des conditions donc différentes d'un sol. Nos résultats sont les premiers étudiant l'effet de l'humidité sur la distribution spatiale des microorganismes dans le sol par visualisation.

Les indices d'agrégation semblent néanmoins augmenter avec la distance aux résidus à pF3,5 bien que cette augmentation ne soit pas significative. Ainsi on peut faire l'hypothèse que lorsque les microorganismes sont dans un microenvironnement pauvre et oligotrophe (sol à distance), ils sont plus agrégés car concentrés autour des rares ressources disponibles. A l'inverse, lorsque les ressources sont plus abondantes, les microorganismes sont plus dispersés bien que l'on n'observe pas d'augmentation du nombre de colonies par ailleurs. Nunan et al. (2003) avaient déjà proposé cette hypothèse après avoir observé que les microorganismes

étaient davantage organisés sous forme de patchs un horizon profond de sol par rapport à un horizon de surface.

Nous avons montré que la présence de macropores structurait la distribution spatiale des microorganismes. L'étude de la localisation des colonies par rapport aux macropores, qui sont ici des pores inter-agrégats, a montré que les microorganismes étaient détectés en majorité à une dizaine de µm des macropores avec un gradient décroissant jusqu'à environ 50 µm de distance. Les macropores étant désaturés, nous faisons l'hypothèse qu'être localisés dans des micropores (saturés en eau) à proximité de macropores (source d'oxygène) est particulièrement favorable au développement des microorganismes. Ceci avait été avancé dans la littérature, mais à notre connaissance pas démontré jusqu'ici. Nunan et al. (2003) ont démontré que les bactéries étaient préférentiellement localisées près des pores dans un horizon profond mais se réfèrent plutôt à la distribution des substrats plutôt localisés dans les pores à cet endroit-là pour expliquer cette répartition.

Quel que soit le pF, ce gradient du nombre de microorganismes est plus faible lorsqu'on est loin du lit de résidus. Kilbertus (1980) et Foster (1988) avaient montré par microscopie électronique que les bactéries étaient plus abondantes à l'intérieur des agrégats que dans les pores plus larges entre les agrégats. Une activité microbienne fortement stimulée à proximité des résidus pourrait entrainer un développement plus important des microorganismes dans les agrégats dans la zone 0-6 mm après diffusion du C soluble, ce qui réduirait la distance moyenne à la macroporosité. Cependant, ce n'est pas ce que l'on observe puisqu'il n'y a pas plus de colonies au contact du résidu par rapport à des zones plus éloignées. C'est le cas à pF3,5 après 45 jours d'incubation mais les gradients de répartition entre pF1,5 et 3.5 après 45 jours sont les mêmes dans les deux cas (1.5 fois plus de microorganismes entre 0-10 qu'entre 10-20).

Les résultats ont également montré que les colonies sont réparties autour des macropores selon un gradient légèrement moins marqué à pF1,5 qu'à pF3,5 et que le gradient de répartition aux macropores est plus faible après 3 jours d'incubation à pF3,5 qu'à pF1,5. Mais celui-ci augmente au cours du temps jusqu'à être équivalent à celui observé à pF1,5 après 45 jours d'incubation.

6.4.4. Distribution spatiale des microorganismes dégradants à une échelle µm

Les résultats NanoSIMS montrent que des microorganismes ont assimilé dans leur biomasse du ^{13}C issu du transfert des résidus vers le sol à pF1,5 et après 7 jours d'incubation (à proximité des résidus). Après 45 jours, le marquage est moindre (à pF1,5 et pF3,5) et peut s'expliquer par le fait que les microorganismes dégradants sont moins nombreux suite à l'épuisement des ressources. Le manque de répétitions ne nous permet malheureusement pas de faire une analyse plus fine.

Nous n'avons en revanche pas pu détecter de microorganismes dégradants dans le sol plus distant alors que nous avions quantifié du ^{13}C et des ^{13}C-PLFA (cf chapitre 3).

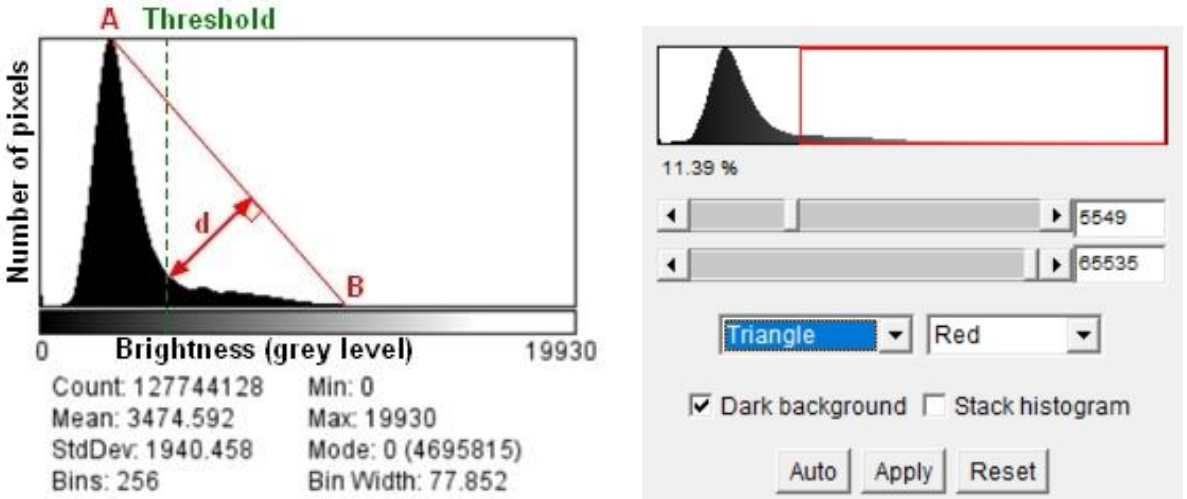
6.5. Conclusion

L'objectif de ce travail était d'étudier l'évolution spatio-temporelle à une échelle micrométrique des microorganismes totaux et actifs après apport d'un résidu marqué au ^{13}C et ce, à différents potentiels matriciels contrastés.
Les données obtenues, suite au développement d'une méthode de traitement d'image adaptée, nous ont permis de constater que l'apport de résidus de maïs dans le sol influe sur le nombre de colonies observées dans le sol. En effet, il a été observé globalement plus de colonies au contact du résidu après 45 jours d'incubation, bien que celles identifiées plus à distance soient de plus grande taille. Par ailleurs, dans ce chapitre, comme dans le précédent, il semblerait que le sol, dans des conditions sèches, favorise le nombre de microorganismes dans le sol.

Si la distribution spatiale des colonies semble peu affectée par la teneur en eau du sol, il semble néanmoins que les colonies soient davantage agrégées à distance du résidu qu'au contact de celui-ci.
Enfin, la distance des colonies aux macropores varie en fonction de la distance aux résidus et du temps d'incubation en conditions sèches. Le gradient de répartition des microorganismes autour des macropores semble être plus fort au contact des résidus et également au fur et à mesure que le temps passe à pF3,5.
Les apports de matières organiques stimulent la croissance des microorganismes avec des

effets observables à une échelle µm. Dans les zones plus éloignées des résidus, les colonies auront tendance à s'agréger autour de matières organiques préexistantes dans le sol.

6.6. Supplementary materials



(a) **(b)**

Figure 81 - Exemple d'histogramme de l'une de nos images (a) et détermination du seuil de binarisation du même histogramme par la méthode du triangle (b). A partir du nombre maximal (A) et minimal (B) de pixels permettant de définir la distance maximale d.



(a) **(b)**

Figure 82 - Exemple d'histogramme de l'une de nos images suite à l'application d'un flou puis d'un traitement Edge detector (a). Détermination du seuil de binarisation du même histogramme par la méthode Huang (b). qui définit un seuil en fonction de la similarité des attributs.

Annexe 1 - Note relative aux figures 83 et 84:

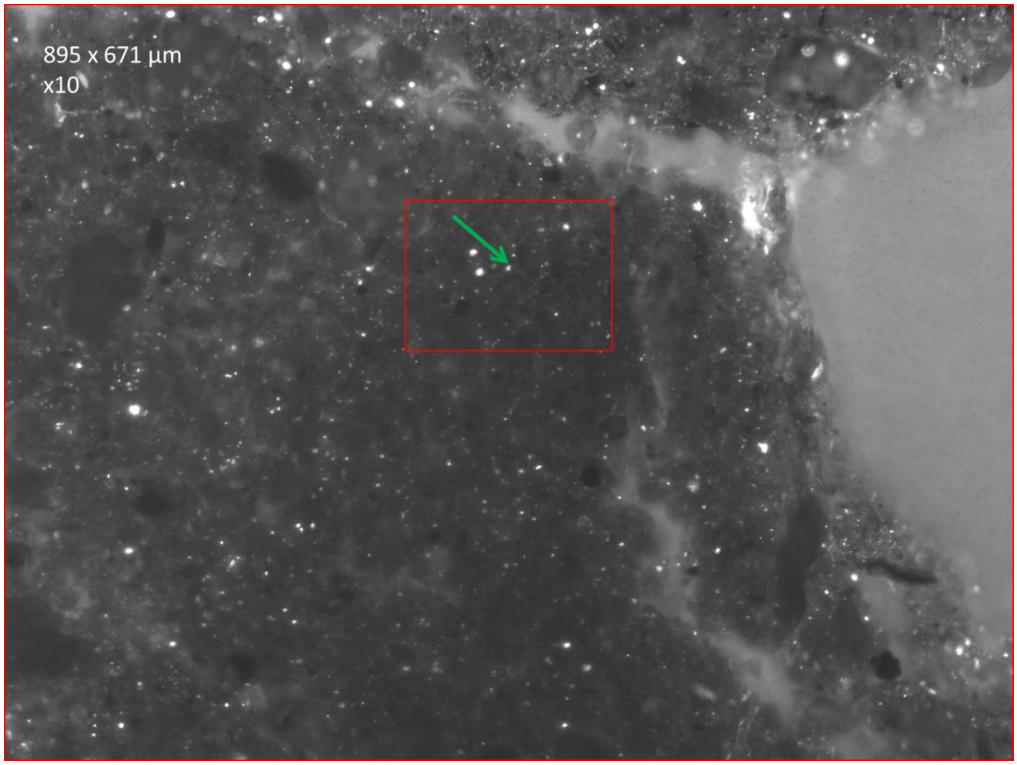
Les acquisitions du sol en fluorescence à l'aide de la loupe binoculaire (utilisées pour cette expérience) ont été comparées à des acquisitions en épi-fluorescence classique à plus fort grossissement en fin d'expérience. Le but étant de s'assurer que la loupe binoculaire (très rarement utilisée pour des observations de microorganismes en sciences du sol) produit des images de qualité comparable ou du moins satisfaisante. Des acquisitions à fort grossissement en microscopie à épifluorescence n'étaient pas envisageables avant de procéder aux acquisitions en nanoSIMS du fait de la nécessité d'utiliser de l'huile à immersion pour les objectifs à fort grossissement en microscopie à épi-fluorescence, ce qui n'est pas compatible avec une utilisation des lames en NanoSIMS. Il a donc fallu attendre la fin de l'expérience pour faire cette vérification.

Les lames minces de sols ont été imagées à l'aide d'un microscope Axio Imager.Z2 muni d'un objectif EC Plan-Nefluar 10x/0.30 M27 (en x10), EC Plan-Nefluar 40x/0.75 M27 (en x40) et Plan-Apochromat 100x/1.40 Oil M27 (en x100) et couplé à une caméra monochromatique AxioCam HR R3 ainsi que d'une lampe Zeiss HXP 120C.

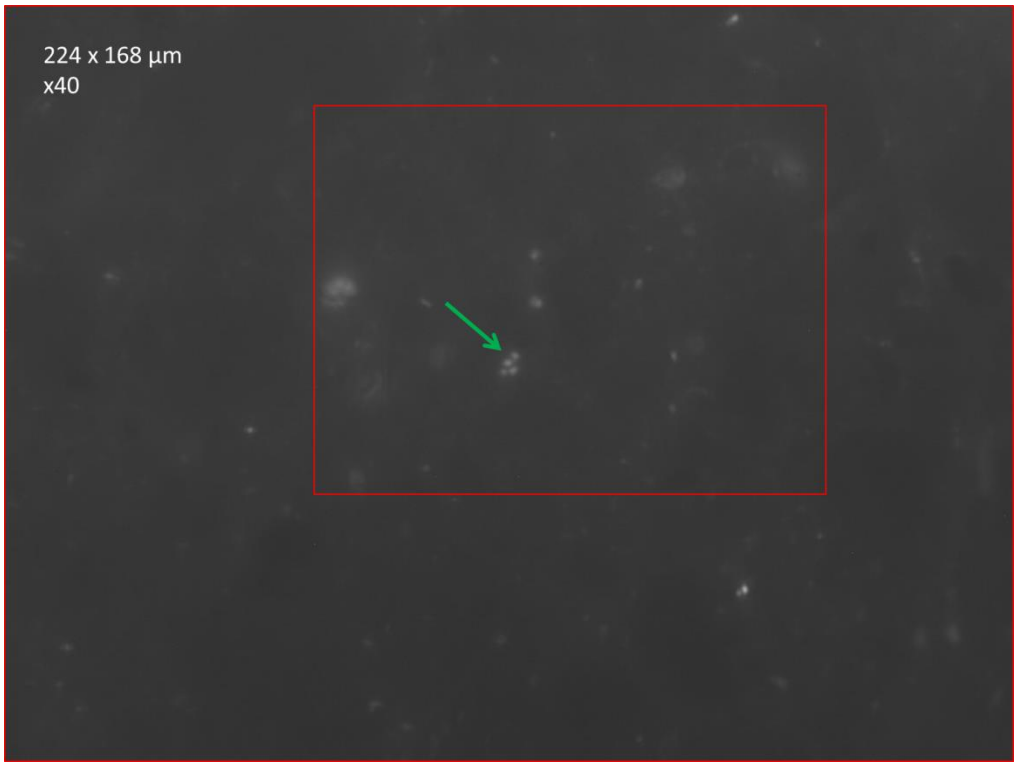
Tableau 10 - Comparaison des caractéristiques des images obtenues selon différents systèmes d'acquisition

Système d'acquisition	**Loupe binoculaire**	**Microscopie à épi-fluorescence**		
Grossissement	X40	X10	X40	X100
résolution	0,25µm	0,65µm	0,16µm	0,065µm
Champ de profondeur	1,68µm	10µm	1,65µm	0,72µm

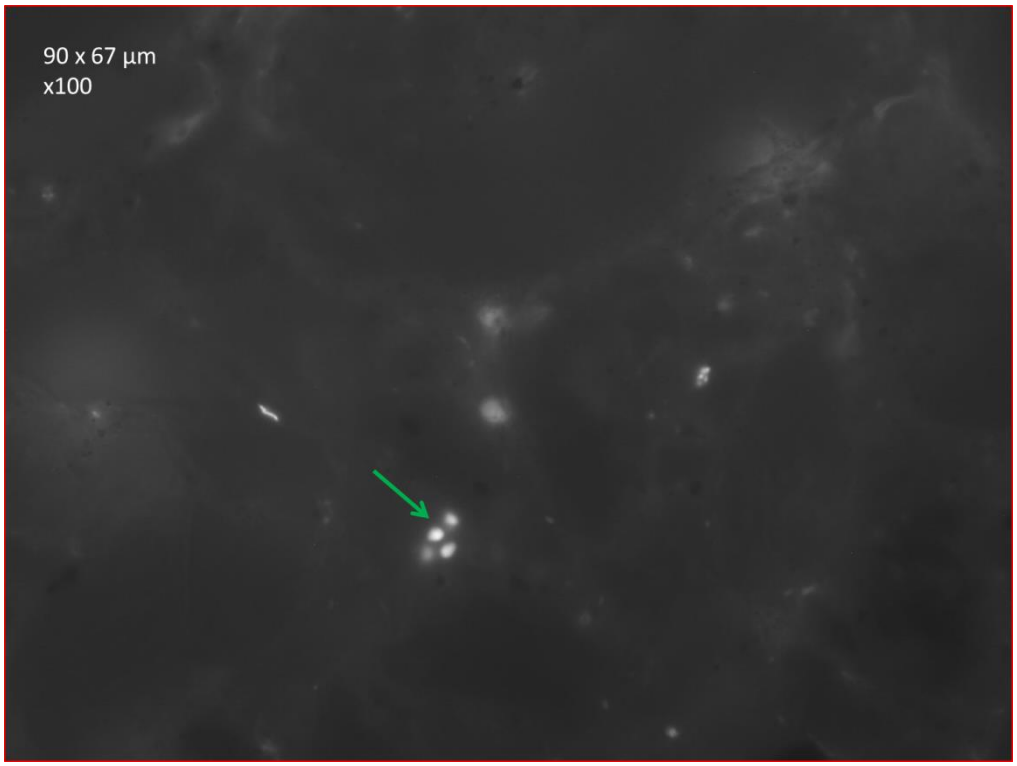
On constate que l'on retrouve les mêmes structures (colonies microbiennes, hyphes de champignons, etc.) et qu'il est même possible d'observer des microorganismes individuels avec la loupe binoculaire. La résolution le permet comme on peut le voir sur l'annexe 1d. Cependant la principale différence est que la profondeur de champ n'est pas la même. On peut voir sur l'annexe 1e qu'entre une acquisition en épi-fluorescence en x10 et une acquisition via la loupe binoculaire (équivalent x40), on observe dans le cas de la loupe binoculaire uniquement les structures à la surface avec une meilleure visibilité des minéraux tandis que beaucoup plus d'objets sont visibles en épi-fluorescence. A noter également qu'en x40 en épi-fluorescence la profondeur de champ diminue également et que les images réalisées par la loupe binoculaire correspondent à une mosaïque d'images en x40 (Tableau 10).



(a)

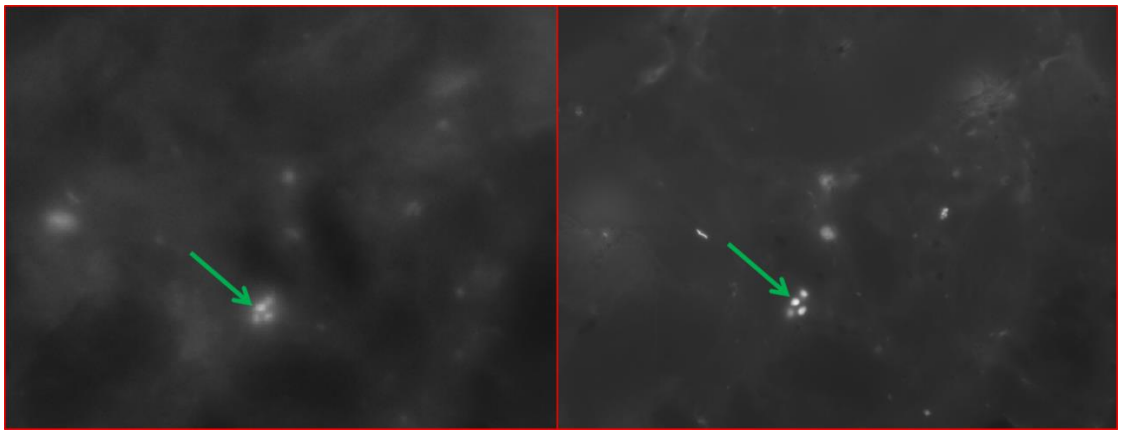


(b)

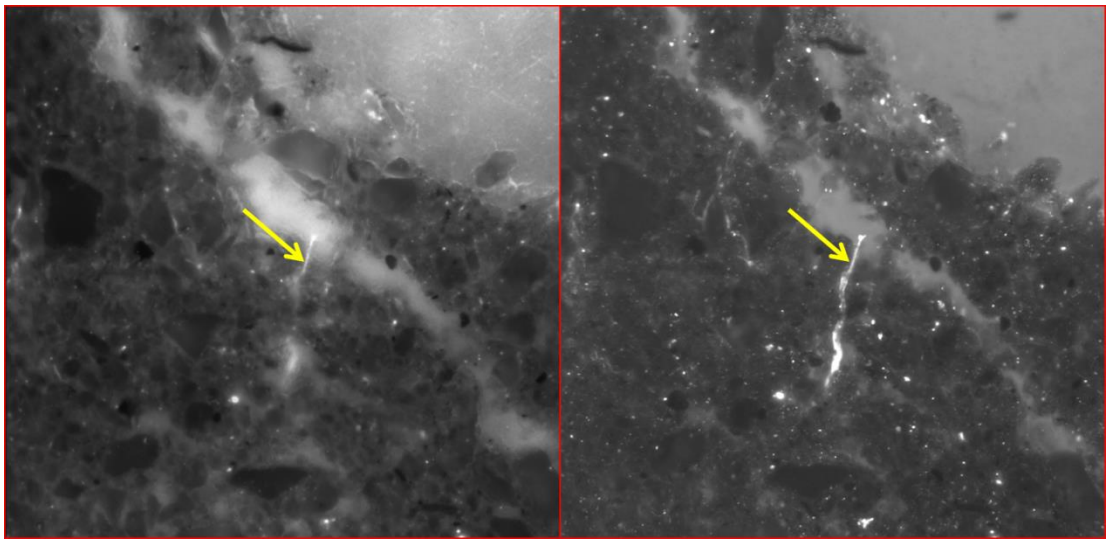


(c)

Figure 83 - Images d'une même zone du sol observée en microscopie à épi-fluorescence en x10 (a), x40 (b) et x100 (c). Les rectangles rouges (a et b) correspondent à la zone de grossissement de l'image et les flèches vertes à une colonie.



(a)



(b)

Figure 84 - Observations réalisées sur les mêmes zones à la loupe binoculaire (à gauche) puis en épi-fluorescence x100 (à droite). Image du sol, de colonies de microorganismes (flèches vertes) (a) et d'un hyphe de champignon (flèches jaunes) (b).

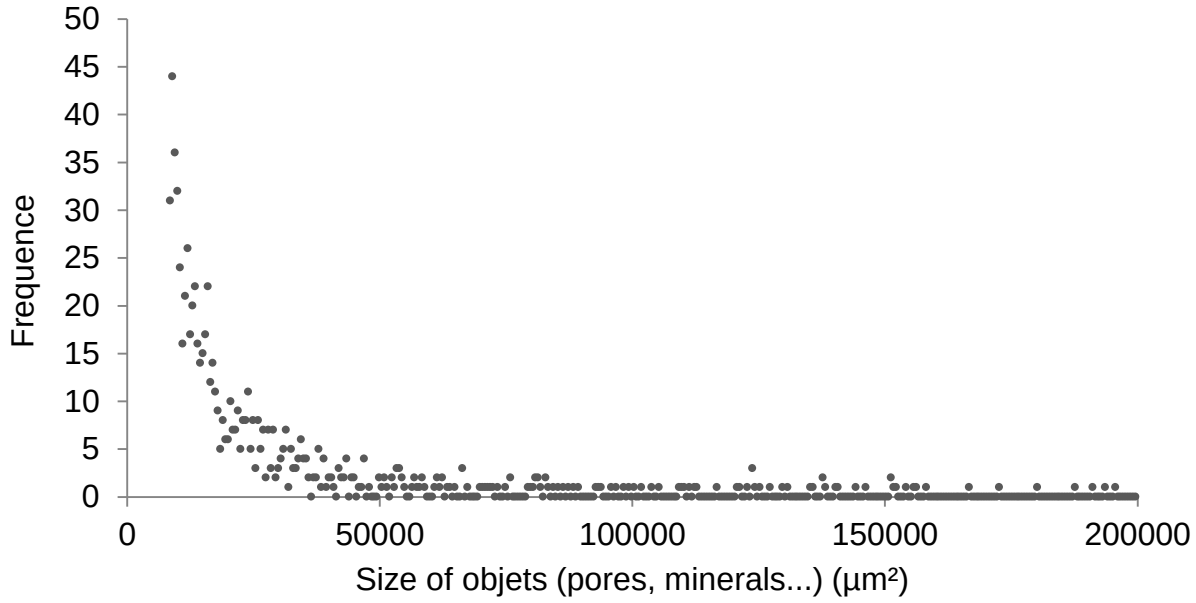


Figure 85 - Fréquence de répartition des pores et minéraux selon leur taille (pour des classes de 500 µm²)

Discussion générale

General discussion

7. Discussion générale

7.1. Objectifs et démarche

L'ensemble des connaissances établies suggèrent que la biodégradation des matières organiques dans le sol est fortement affectée par l'accessibilité de ces substrats aux microorganismes qui les dégradent (Pinheiro et al., 2015). Ce lien semble lui-même fonction de plusieurs facteurs : (i) la localisation initiale aussi bien des substrats que des microorganismes (Coppens et al., 2006; Pinheiro et al., 2015), (ii) de l'organisation du réseau poral du sol (Sleutel et al., 2012; Juarez et al., 2013; Negassa et al., 2015), (iii) de son degré de remplissage par l'eau (Poll et al., 2008) mais aussi (iv) de la structure de la communauté microbienne du sol dont les populations peuvent montrer des capacités d'exploration du milieu variées (Coleman et al., 2018).

Peu d'études ont été réalisées dans le but d'analyser l'effet comparé de ces facteurs ou l'effet de leur interaction. La détritusphere, volume de sol impacté par la biodégradation d'un substrat organique a déjà été étudiée et caractérisée (Kandeler, 1999; Gaillard et al., 1999, 2003; Poll et al., 2006, 2008) mais il existe peu de connaissances sur la relation entre ce volume et la minéralisation des substrats organiques.

Par ailleurs, l'humidité du sol est un facteur clé, modulant les transferts dans le sol via l'advection ou la diffusion des substrats solubles, mais aussi celle des gaz ou des microorganismes et si certaines études ont mis en relation détritusphère et humidité du sol, aucune ne s'est penchée sur le cas des sols secs (> pF3). Il existe également peu de travaux sur le fonctionnement de la détritusphère à l'échelle de l'habitat des microorganismes et de données sur leur répartition en fonction des apports de matières organiques et de la teneur en eau. La mise en évidence de ces manques nous a amené à réaliser ce travail de recherche dont l'objectif a été d'évaluer l'impact de facteurs de régulation abiotiques i.e. la teneur en eau et les apports de résidus végétaux au sol sur la biodégradation au sein de la detritusphère.

Pour répondre à ces objectifs, nous avons développé une approche expérimentale comprenant des incubations en microcosmes de sol, auxquels nous avons appliqué 3 différents potentiels matriciels dont un en conditions sèches. L'activité et le devenir des microorganismes ainsi que du carbone ont été suivis via des mesures de minéralisation, des analyses élémentaires, isotopiques et biologiques. La localisation des microorganismes et de leur activité *in situ* a

également été suivie et visualisée par microscopie à fluorescence et par nanoSIMS. Différentes échelles spatiales ont été explorées. Une partie du travail a été réalisée sur des systèmes de taille centimétrique à millimétrique puis une autre partie a été effectuée à des échelles millimétrique à micrométrique afin de mettre en relation les phénomènes observés à l'échelle du cosme et ceux observés à l'échelle de l'habitat microbien.

7.2. Quel est l'impact du potentiel matriciel et en particulier d'une condition de sol sec sur la biodégradation de résidus végétaux localisés ?

La teneur en eau du sol influe sur la biodégradation des matières organiques apportées en couche. La minéralisation observée est fonction de la quantité d'eau présente dans la porosité et plus forte en condition humide qu'en condition sèche sur des temps courts (inférieurs à 70 jours dans notre cas) (Tableau 11). L'effet est cependant moins clair au-delà de cette période avec une minéralisation à pF3,5 qui devient plus forte que la minéralisation d'un sol à pF2,5 bien que les deux restent inférieures à la minéralisation observée en condition très humide, à pF1,5.

Ainsi, si les proportions finales de résidu biodégradé à l'issue de l'incubation diffèrent selon la teneur en eau, en revanche les dynamiques de dégradation, elles, sont similaires quelle que soit l'humidité du sol et ce durant toute la durée de l'incubation (601 jours).

7.3. Quels volumes de sol et quelles communautés microbiennes sont impliqués dans la détritusphère et comment sont-ils modulés par la teneur en eau ?

La détritusphère se met en place en quelques jours seulement et constitue une zone de quelques millimètres autour des résidus ce qui est cohérent avec les résultats obtenus lors d'études similaires pour différents types de résidus et conditions expérimentales (Tableau 11). En effet, la majeure partie du carbone transféré depuis le résidu dans le sol se trouve dans les 2 premiers millimètres du sol adjacent aux résidus. La teneur en eau joue alors un rôle dans l'étalement de cette zone jusqu'à 12 millimètres au moins des résidus où l'on observe pour les cas les plus humides du carbone provenant des résidus dès 3 jours d'incubation alors que cette extension n'est observée qu'après 45 jours dans le cas le plus sec. L'humidité ne joue donc pas sur la taille de la détritusphère en fin d'incubation, mais influence l'évolution temporelle de sa mise en place, plus lente en condition sèche. Cela concerne cependant de très faibles

quantités de carbone. Les bilans de carbone effectués suggèrent que la plus grande partie de la minéralisation observée à lieu au sein même des résidus.

L'impact de la répartition des ressources a eu un effet sur les communautés de microorganismes avec globalement plus de microorganismes en conditions sèches et dans les 2 premiers millimètres de sol au contact des apports et la mise en place d'une succession bactéries champignons au contact du résidu d'autant plus forte que la teneur en eau diminue. Cet effet particulièrement marqué en conditions sèches peut s'expliquer par une bonne adaptation des champignons aux environnements relativement secs. Cependant, l'analyse des communautés microbiennes dégradantes après 7 jours d'incubation ne montre pas différence entre conditions sèches et humides et a permis de constater qu'aussi bien les bactéries que les champignons étaient impliqués dans la biodégradation du résidu même en début d'incubation. Il a pu être décelé un fort gradient de microorganismes ayant assimilé le marquage depuis le résidu vers le sol avec un gradient plus fort en condition sèche qu'en condition humide laissant supposer un meilleur transfert des composés solubles en début d'incubation. La détritusphère n'avait pas été étudiée antérieurement en conditions sèches : nous avons montré que sa dimension ne diffère pas en fait mais que les dynamiques de mise en place sont plus lentes qu'en conditions humides.

Ces travaux montrent donc que la relation entre volume de sol impliqué et biodégradation n'est pas simple. Nous n'avons pas mis en évidence de variation du volume de sol impliqué dans la biodégradation aussi contrastée que nous avions supposé au départ et pourtant la biodégradation est très affectée par les conditions hydriques. Il semblerait que la biodégradation du résidu soit possiblement plus en lien avec les processus ayant lieu au sein même du résidu et pouvant être modulée par la teneur en eau. La forte corrélation entre quantité de résidus présents dans le système et quantité de carbone minéralisé indique qu'un lien plus direct existe entre quantité de résidus et minéralisation plutôt qu'entre volume de sol impliqué et minéralisation. En conséquence, si la biodégradation est en lien avec les processus ayant lieu directement au sein du résidu, cela questionne sur l'importance du sol de la détritusphère dans la biodégradation de résidus complexes. Par contre, un aspect que nous n'avons pas étudié est le devenir du carbone incorporé dans la détritusphère selon les conditions hydriques : est-il stabilisé de la même manière ?

7.4. Quel est l'impact du potentiel matriciel sur le priming effect après apport de résidus végétaux au sol ?

Nous avons observé que le priming effect est modulé par l'état hydrique du sol. L'augmentation du pF retarde le priming effect et augmente son intensité dans le temps (Tableau 11). Cet effet ne semble pas être en relation avec l'humidité du sol de façon simple puisque, bien que les potentiels matriciels soient choisis régulièrement espacés, les dynamiques observées semblent indiquer un effet de seuil au-delà duquel les observations diffèrent. Ainsi, les dynamiques et amplitudes sont similaires aux pF1,5 et 2,5 mais différentes à pF3,5.

La phase initiale du priming effect est directement en relation avec les transferts de carbone et la teneur en eau du sol quand les phases ultérieures montrent des mécanismes plus complexes où le développement lent de microorganismes spécialisés dans la dégradation des matières organiques plus complexes, comme les champignons, notamment en conditions sèches, a pu prendre de plus en plus d'importance dans la dégradation du résidu et le priming effect observés. Le développement apparent des champignons qui a lieu après 45 jours d'incubation et particulièrement prononcé en conditions sèches peut à la fois expliquer le priming effect plus fort à pF3,5 mais aussi le croisement des courbes de minéralisation observé lors de la dégradation du résidu entre les pF1,5 et 2,5 d'une part et pF3,5 d'autre part.

7.5. Quel est l'impact du potentiel matriciel sur la répartition des microorganismes dans le sol ?

Par ailleurs, les observations microscopiques et les analyses effectuées sur les communautés microbiennes convergent vers un même résultat où il semblerait que le sol en conditions sèches favorise le nombre de microorganismes dans le sol (Tableau 11).

Si la répartition des colonies entre-elles semble peu affectée par la teneur en eau du sol, une tendance se dégage vers une agrégation des colonies plus importante à distance du résidu en conditions sèches. De même un gradient de distribution des microorganismes s'établit plus lentement autour des macropores à pF3.5 qu'à pF1.5. Il semble donc que l'augmentation du potentiel matriciel et de la diffusion des matières solubles au sein de la porosité favorise la présence (via mobilité ou croissance) des microorganismes au contact des matières

organiques apportées.

7.6. Quels sont les sites de biodégradation de la matière organique dans le sol ?

Les acquisitions en nanoSIMS montrent que des microorganismes ont assimilé dans leur biomasse du ^{13}C issu du transfert des résidus vers le sol à pF1,5 et après 7 jours d'incubation (Tableau 11). Le marquage, moindre à 45 jours (à pF1,5 et 3,5), peut s'expliquer par le fait que les microorganismes ayant assimilé du ^{13}C dans leur biomasse sont morts et/ou ont libéré le ^{13}C qui a alors été minéralisé à ce moment de l'incubation.

Bien que ne disposant que de trop peu de résultats pour conclure véritablement, cela met possiblement en avant la rapidité des activités de biodégradation comme cela a déjà été constaté lors des autres expérimentations, où la majorité des transferts sont observés en quelques jours et le maximum d'activité de biodégradation a lieu au bout de 7 jours seulement. En revanche, la réorganisation des communautés microbiennes observée en fluorescence est un phénomène qui prend plus de temps comme cela est relevé également par la modification des communautés, via le ratio champignons bactéries, moins rapide.

Tableau 11 - Récapitulatif des principaux résultats obtenus sur l'ensemble des observations en fonction du potentiel matriciel, de la distance aux résidus apportés et du temps d'incubation.

Variable observée	pF	Distance	Temps
Dégradation du résidu	pF1,5 > pF3,5	Résidus > sol (effet déduit)	Maximale à 7 jours pour tous les pF
Priming effect	pF1,5 > pF3,5 (avant 200 jours) pF1,5 < pF3,5 (après 200 jours)	-	Durée de 70 jours à pF1,5 durée de 300 jours à pF3,5
Taille détritusphère	pF1,5 > pF3,5 (avant 7 jours) pF1,5 = pF3,5 (après 15 jours)	Majoritairement <2 mm et jusqu'à 12 mm	mise en place dès 3 jours à pF1,5 mise en place à 15 jours à pF3,5
Communautés microbienne	pF1,5 = pF3,5 (à 3 jours pF1,5 ≠ pF3,5 (dès 7 jours)	Résidus ≠ sol	Différenciation des communautés entre les jours 3 et 45 de l'incubation vers plus de champignons
Communautés microbienne dégradantes	pF1,5 = pF3,5	Résidus > sol	-
Nombre de colonies	pF1,5 < pF3,5	Résidus > sol après 45 jours	Diminution dans le temps à pF1.5 Augmentation dans le temps à pF3.5
Taille des colonies	pF1,5 = pF3,5	Résidus < sol après 45 jours	Augmentation de la taille des colonies entre 3 et 45 jours
Agrégation des colonies	pF1,5 = pF3,5	Résidus < sol (effet léger)	Pas d'effet observé
Gradient de répartition autour des pores	pF1,5 < pF3,5	Résidus > sol	Mise en place dès 3 jours à pF1,5 Mise en place plus tardive à pF3,5

7.7. Limites et perspectives

Cette étude de la détritusphère aurait gagné à pouvoir présenter plus de résultats directement en lien avec la dégradation *in situ* des apports, i.e. directement depuis la couche de résidus où il semble qu'une grande partie de la biodégradation y ait lieu. Egalement, le manque de données expérimentales concernant les communautés totales dégradantes dans cette couche et plus globalement dans le temps aurait permis de véritablement apporter des conclusions

concernant la mise en place d'une succession bactéries champignons dont nous faisons l'hypothèse. Enfin, des expérimentations prenant notamment en compte l'utilisation de l'azote du sol pour la dégradation de résidus en C/N élevé pourrait permettre de mieux compléter ces connaissances sur le volume de sol pouvant être impliqué en prenant en compte les données obtenues lors des mesures du priming effect.

Par ailleurs, l'utilisation de méthodes d'observations comme la microscopie à fluorescence et la nanoSIMS est loin d'être courante et triviale depuis la fabrication des lames au traitement des images et il est vrai que ces méthodes ne fournissent pas toujours des résultats totalement fiables.

Bien que cette étude permette de comparer des échantillons de même type entre eux, l'absence d'un témoin satisfaisant pour estimer la part d'auto-fluorescence du sol est un problème afin de s'assurer de la quantité de colonies détectées dans les images. De même, les images obtenues et leur traitement n'ont pas permis d'effectuer une détection totale des champignons qui ont été grandement sous-estimés dans cette partie du travail réalisé. Cela est regrettable au regard des conclusions obtenues concernant leur implication dans les quantités finales de résidus biodégradé et dans le priming effect observé. Aussi le traitement d'images par lui-même a pu sous-estimer le nombre de microorganismes selon les critères utilisés.

Concernant les observations en nanoSIMS, bien que cette méthode permette des avancées certaines dans la cartographie élémentaire et isotopique des sols, l'impossibilité de réaliser un grand nombre d'images, la difficulté à trouver les zones marquées et les dimensions des acquisitions qui n'assurent pas une représentativité du sol satisfaisante en font une méthode encore difficilement utilisable pour ce type de questions.

Aussi, contrairement à nos espérances, il s'est avéré très difficile de lier images en fluorescence avec images en nanoSIMS à cause de leur dimensions d'une part, mais aussi du fait qu'il est extrêmement difficile de retrouver les mêmes zones sur des images obtenues avec une épaisseur de quelques microns dans le cas de la fluorescence avec des images ne permettant des acquisitions que les objets de surface en nanoSIMS. Il est en réalité possible de repérer les coordonnées des zones à acquérir afin de les retrouver plus facilement par la suite mais nos échantillons ne l'ont pas permis de par la difficulté à pouvoir présupposer des zones pouvant être marquées avant les dites observations.

L'utilisation de fonction de répartition des microorganismes dans le sol et en fonction de la distance aux pores n'avait pas encore été utilisée pour caractériser la répartition des

microorganismes selon la teneur en eau du sol. Egalement peu d'études proposent ce type de résultats au sein de la détritusphère. Les résultats de nos expérimentations apportent donc des connaissances nouvelles qui peuvent être utilisées pour décrire les sols. De même, la description des transferts de carbone vers le sol en fonction de la teneur en eau et leur lien direct avec le priming effect et la minéralisation des résidus pourraient être utilisés pour modéliser et décrire le devenir des résidus végétaux dans les sols. Les modèles utilisés actuellement pour décrire la biodégradation des matières organiques du sol prennent maintenant en compte l'hétérogénéité du sol et pourraient tout à fait prendre en compte la répartition des microorganismes à l'échelle de leur habitat afin de proposer de nouveaux scénarii.

Conclusion

Conclusion

8. Conclusion

La détritusphere et son fonctionnement ont déjà été caractérisés en sciences du sol mais peu d'informations existent à l'heure actuelle sur son fonctionnement selon la teneur en eau du sol et aucune n'étudie les conditions sèches. Par ailleurs, le fonctionnement à micro-échelle de cette sphère d'influence est encore très mal connu.

Ce travail nous a permis de constater que si la minéralisation et le priming effect observés sont fonction de l'humidité du sol, cette relation n'est pas simple, particulièrement en conditions sèches et pour des durées de plusieurs mois, dépassant les conditions expérimentales courantes. Bien que les vitesses des transferts de carbone vers le sol soient dépendantes de la teneur en eau, le volume de la détritusphère n'en est pas pour autant influencé.

Le développement des microorganismes suggère une succession bactéries champignons au fur et à mesure de la biodégradation à l'origine d'un priming effect particulièrement en conditions sèches. L'étude des microorganismes dégradants montre que les bactéries comme les champignons sont très tôt impliqués dans la biodégradation du résidu.

A l'échelle de l'habitat microbien il semblerait que le facteur majeur de la répartition des microorganismes soit la localisation de ressources trophiques plutôt que la teneur en eau du sol. En effet, bien que l'eau puisse avoir une influence sur la répartition des microorganismes à échelle micrométrique dans la mesure où elle occupe le réseau poral, elle peut moduler la dispersion des ressources influençant la position des microorganismes selon les voies de transferts préférentielles que sont les pores.

L'étude des processus ayant lieu au sein même des résidus et l'évolution des communautés microbiennes dégradantes pourraient permettre d'apporter plus de réponses. De même la mise en relation du priming effect observé avec le devenir de l'azote du sol pourraient permettre de mieux comprendre les dynamiques particulières observées en conditions sèches.

Les difficultés à concilier, sur de mêmes échantillons, l'utilisation de la microscopie à fluorescence et du nanosims, restent des freins à l'acquisition de données de répartition des microorganismes et microorganismes dégradants pourtant indispensables à la compréhension des processus et interactions dans les sols. Ce type de données concernant les transferts de carbone vers les sols, le développement des microorganismes et leur lien avec la biodégradation ainsi que la répartition des microorganismes à micro-échelle pourrait permettre d'améliorer et d'offrir plus de possibilité de scenarii aux modèles actuellement utilisés pour décrire la biodégradation des matières organiques du sol.

Références bibliographiques

Bibliographic references

Références

Altemüller, H.-J., Van Vliet-Lanoe, B., 1990. Soil thin section fluorescence microscopy. Dev. Soil Sci. 19, 565–579.

Angers, D.A., Recous, S., 1997. Decomposition of wheat straw and rye residues as affected by particle size. Plant Soil 189, 197–203.

Asmar, F., Eiland, F., Nielsen, N.E., 1994. Effect of extracellular-enzyme activities on solubilization rate of soil organic nitrogen. Biol. Fertil. Soils 17, 32–38. https://doi.org/10.1007/BF00418669

Autret, B., Mary, B., Chenu, C., Balabane, M., Girardin, C., Bertrand, M., Grandeau, G., Beaudoin, N., 2016. Alternative arable cropping systems: A key to increase soil organic carbon storage? Results from a 16 year field experiment. Agric. Ecosyst. Environ. 232, 150–164. https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.07.008

Babey, T., Vieublé-Gonod, L., Rapaport, A., Pinheiro, M., Garnier, P., de Dreuzy, J.-R., 2017. Spatiotemporal simulations of 2,4-D pesticide degradation by microorganisms in 3D soil-core experiments. Ecol. Model. 344, 48–61. https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2016.11.006

Baddeley, A., Rubak, E., Turner, R., 2015. Spatial Point Patterns: Methodology and Applications with R. Lond. Chapman HallCRC Press.

Baldock, J.A., Skjemstad, J.O., 2000. Role of the soil matrix and minerals in protecting natural organic materials against biological attack. Org. Geochem. 31, 697–710. https://doi.org/10.1016/S0146-6380(00)00049-8

Balesdent, J., Chenu, C., Balabane, M., 2000. Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage. Soil Tillage Res. 53, 215–230. https://doi.org/10.1016/S0167-1987(99)00107-5

Baschien, christiane, manz, werner, neu, thomas R., Szewzyk, U., 2001. Fluorescence in situ hybridization of freshwater fungi. Intern. Rev Hydrobiol 86, 371–381.

Basile-Doelsch, I., Balesdent, J., Pellerin, S., 2020. Reviews and syntheses: The mechanisms underlying carbon storage in soil. Biogeosciences 17, 5223–5242. https://doi.org/10.5194/bg-17-5223-2020

Bastian, F., Bouziri, L., Nicolardot, B., Ranjard, L., 2009. Impact of wheat straw decomposition on successional patterns of soil microbial community structure. Soil Biol. Biochem. 41, 262–275. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.10.024

Baveye, P.C., Laba, M., Otten, W., Bouckaert, L., Dello Sterpaio, P., Goswami, R.R., Grinev, D., Houston, A., Hu, Y., Liu, J., Mooney, S., Pajor, R., Sleutel, S., Tarquis, A., Wang, W., Wei, Q., Sezgin, M., 2010. Observer-dependent variability of the thresholding step in the quantitative analysis of soil images and X-ray microtomography data. Geoderma 157, 51–63. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2010.03.015

Baveye, P.C., Otten, W., Kravchenko, A., Balseiro-Romero, M., Beckers, É., Chalhoub, M., Darnault, C., Eickhorst, T., Garnier, P., Hapca, S., Kiranyaz, S., Monga, O., Mueller, C.W., Nunan, N., Pot, V., Schlüter, S., Schmidt, H., Vogel, H.-J., 2018. Emergent Properties of Microbial Activity in Heterogeneous Soil Microenvironments: Different Research Approaches Are Slowly Converging, Yet Major Challenges Remain. Front. Microbiol. 9, 1929. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01929

Beare, M.H., Coleman, D.C., Crossley Jr, D.A., Hendrix, P.F., Odum, E.P., 1995. A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. Plant Soil 170, 5–22.

Berleman, J.E., Zemla, M., Remis, J.P., Liu, H., Davis, A.E., Worth, A.N., West, Z., Zhang, A., Park, H., Bosneaga, E., others, 2016. Exopolysaccharide microchannels direct bacterial motility and organize multicellular behavior. ISME J. 10, 2620–2632.

Bingeman, C.W., Varner, J.E., Martin, W.P., 1953. The Effect of the Addition of Organic Materials on the Decomposition of an Organic Soil1. Soil Sci. Soc. Am. J. 17, 34. https://doi.org/10.2136/sssaj1953.03615995001700010008x

Binnig, G., Quate, C.F., Gerber, C., 1986. Atomic force microscope. Phys. Rev. Lett. 56, 930.

Blagodatskaya, E., Kuzyakov, Y., 2013. Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches. Soil Biol. Biochem. 67, 192–211. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.08.024

Blagodatskaya, E., Kuzyakov, Y., 2008. Mechanisms of real and apparent priming effects and their dependence on soil microbial biomass and community structure: critical review. Biol. Fertil. Soils 45, 115–131. https://doi.org/10.1007/s00374-008-0334-y

Bleuet, P., Gergaud, P., Lemelle, L., Bleuet, P., Tucoulou, R., Cloetens, P., Susini, J., Delette, G., Simionovici, A., 2010. 3D chemical imaging based on a third-generation synchrotron source. TrAC Trends Anal. Chem. 29, 518–527. https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.02.011

Borisov, S.M., Seifner, R., Klimant, I., 2011. A novel planar optical sensor for simultaneous monitoring of oxygen, carbon dioxide, pH and temperature. Anal. Bioanal. Chem. 400, 2463–2474. https://doi.org/10.1007/s00216-010-4617-4

Bouvier, T., Del Giorgio, P.A., 2003. Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): A quantitative review of published reports. FEMS Microbiol. Ecol. 44, 3–15. https://doi.org/10.1016/S0168-6496(02)00461-0

Broadbent, F.E., 1948. Nitrogen Release and Carbon Loss from Soil Organic Matter during Decomposition of Added Plant Residues. Soil Sci. Soc. Am. J. 12, 246. https://doi.org/10.2136/sssaj1948.036159950012000C0057x

Broadbent, F.E., Norman, A.G., 1947. Some Factors Affecting the Availability of the Organic Nitrogen In Soil—A Preliminary Report1. Soil Sci. Soc. Am. J. 11, 264. https://doi.org/10.2136/sssaj1947.036159950011000C0050x

Bruneau, P.M.C., Davidson, D.A., Grieve, I.C., Young, I.M., Nunan, N., 2005. The effects of soil horizons and faunal excrement on bacterial distribution in an upland grassland soil. FEMS Microbiol. Ecol. 52, 139–144. https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.10.010

Busse, M.D., Sanchez, F.G., Ratcliff, A.W., Butnor, J.R., Carter, E.A., Powers, R.F., 2009. Soil carbon sequestration and changes in fungal and bacterial biomass following incorporation of forest residues. Soil Biol. Biochem. 41, 220–227. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.10.012

Calvelo Pereira, R., Camps Arbestain, M., Kelliher, F.M., Theng, B.K.G., McNally, S.R., Macías, F., Guitián, F., 2019. Assessing the pore structure and surface area of allophane-rich and non-allophanic topsoils by supercritical drying and chemical treatment. Geoderma 337, 805–811. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.10.037

Calvet, R., 2013a. Constitution et structure des sols (partie 1), Constituants organiques des sols (chapitre 2), in: Le Sol, Agriproduction. Editions France Agricole, Paris, pp. 44–81.

Calvet, R., 2013b. Les phénomène dans les sols (partie 2), Phénomènes physiques (chapitre 2), in: Le Sol, Agriproduction. Editions France Agricole, Paris, pp. 246–364.

Carminati, A., Kaestner, A., Ippisch, O., Koliji, A., Lehmann, P., Hassanein, R., Vontobel, P., Lehmann, E., Laloui, L., Vulliet, L., Flühler, H., 2007. Water flow between soil aggregates. Transp. Porous Media 68, 219–236. https://doi.org/10.1007/s11242-006-9041-z

Carminati, A., Moradi, A.B., Vetterlein, D., Vontobel, P., Lehmann, E., Weller, U., Vogel, H.-J., Oswald, S.E., 2010. Dynamics of soil water content in the rhizosphere. Plant Soil 332, 163–176. https://doi.org/10.1007/s11104-010-0283-8

Chen, M.-Y., Lee, D.-J., Tay, J.-H., Show, K.-Y., 2007. Staining of extracellular polymeric substances and cells in bioaggregates. Appl. Microbiol. Biotechnol. 75, 467–474. https://doi.org/10.1007/s00253-006-0816-5

Chenu, C., Hassink, J., Bloem, J., 2001. Short-term changes in the spatial distribution of microorganisms in soil aggregates as affected by glucose addition. Biol. Fertil. Soils 34, 349–356. https://doi.org/10.1007/s003740100419

Chenu, C., Jaunet, A.M., 1992. Cryoscanning electron microscopy of microbial extracellular polysaccharides and their association with minerals. Scanning 14, 360–364.

Chenu, C., Plante, A.F., 2006. Clay-sized organo-mineral complexes in a cultivation chronosequence: revisiting the concept of the "primary organo-mineral complex." Eur. J. Soil Sci. 57, 596–607. https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2006.00834.x

Chenu, C., Rumpel, C., Lehmann, J., 2015. Methods for Studying Soil Organic Matter, in: Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry. Elsevier, pp. 383–419. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415955-6.00013-X

Chenu, C., Stotzky, G., 2002. Interaction between microorganisms and soil particles: an overview, in: Huang, P.M., Bollag, P.M., Senesi, N. (Eds.), Interaction between Soil Particles and Microorganisms. Impact on the Terrestrial Ecosystem, IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems. John Wiley & Sons, New York, pp. 3–40.

Chenu, C., Tessier, D., 1995. Low temperature scanning electron microscopy of clay and organic constituents and their relevance to soil microstructures. Scanning Microsc. 9, 989–1010.

Chowdhury, N., Marschner, P., Burns, R., 2011. Response of microbial activity and community structure to decreasing soil osmotic and matric potential. Plant Soil 344, 241–254. https://doi.org/10.1007/s11104-011-0743-9

Cliff, J.B., Gaspar, D.J., Bottomley, P.J., Myrold, D.D., 2002. Exploration of Inorganic C and N Assimilation by Soil Microbes with Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4067–4073. https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.4067-4073.2002

Coleman, D.C., Callaham, M.A., Crossley, Jr, D.A., 2018. Secondary production: activities of heterotrophic organisms - microbes, in: Coleman, D.C., Callaham, M., Crossley Jr, D.A. (Eds.), Fundamental of Soil Ecology. Academic Press, Cambridge, pp. 47–76.

Coleman, D.C., Wall, D.H., 2015. Soil Fauna, in: Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry. Elsevier, pp. 111–149. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415955-6.00005-0

Coppens, F., Garnier, P., De Gryze, S., Merckx, R., Recous, S., 2006. Soil moisture, carbon and nitrogen dynamics following incorporation and surface application of labelled crop residues in soil columns. Eur. J. Soil Sci. 57, 894–905. https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2006.00783.x

Dalenberg, J.W., Jager, G., 1989. Priming effect of some organic additions to 14C-labelled soil. Soil Biol. Biochem. 21, 443–448. https://doi.org/10.1016/0038-0717(89)90157-0

Dechesne, A., Owsianiak, M., Bazire, A., Grundmann, G.L., Binning, P.J., Smets, B.F., 2010. Biodegradation in a Partially Saturated Sand Matrix: Compounding Effects of Water Content, Bacterial Spatial Distribution, and Motility. Environ. Sci. Technol. 44, 2386–2392. https://doi.org/10.1021/es902760y

Desbois, G., Urai, J.L., Houben, M.E., Sholokhova, Y., 2010. Typology, morphology and connectivity of pore space in claystones from reference site for research using BIB, FIB and cryo-SEM methods. EPJ Web Conf. 6, 22005. https://doi.org/10.1051/epjconf/20100622005

Dungait, J.A.J., Hopkins, D.W., Gregory, A.S., Whitmore, A.P., 2012. Soil organic matter turnover is governed by accessibility not recalcitrance. Glob. Change Biol. 18, 1781–1796. https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2012.02665.x

Ebrahimi, A.N., Or, D., 2014. Microbial dispersal in unsaturated porous media: Characteristics of motile bacterial cell motions in unsaturated angular pore networks. Water Resour. Res. 50, 7406–7429. https://doi.org/10.1002/2014WR015897

Eickhorst, T., Tippkötter, R., 2008a. Detection of microorganisms in undisturbed soil by combining fluorescence in situ hybridization (FISH) and micropedological methods. Soil Biol. Biochem. 40, 1284–1293. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.06.019

Eickhorst, T., Tippkötter, R., 2008b. Improved detection of soil microorganisms using fluorescence in situ hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition (CARD-FISH). Soil Biol. Biochem. 40, 1883–1891. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.03.024

Ekschmitt, K., Kandeler, E., Poll, C., Brune, A., Buscot, F., Friedrich, M., Gleixner, G., Hartmann, A., Kästner, M., Marhan, S., Miltner, A., Scheu, S., Wolters, V., 2008. Soil-carbon preservation through habitat constraints and biological limitations on

decomposer activity. J. Plant Nutr. Soil Sci. 171, 27–35. https://doi.org/10.1002/jpln.200700051

Ekschmitt, K., Liu, M., Vetter, S., Fox, O., Wolters, V., 2005. Strategies used by soil biota to overcome soil organic matter stability — why is dead organic matter left over in the soil? Geoderma 128, 167–176. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.12.024

Elsass, F., Chenu, C., Tessier, D., 2008. Transmission Electron Microscopy for Soil Samples: Preparation Methods and Use, in: Ulery, A.L., Richard Drees, L. (Eds.), Methods of Soil Analysis Part 5—Mineralogical Methods. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison, WI, USA, pp. 235–268. https://doi.org/10.2136/sssabookser5.5.c9

Elyeznasni, N., Sellami, F., Pot, V., Benoit, P., Vieublé-Gonod, L., Young, I., Peth, S., 2012. Exploration of soil micromorphology to identify coarse-sized OM assemblages in X-ray CT images of undisturbed cultivated soil cores. Geoderma 179–180, 38–45. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2012.02.023

Fanin, N., Alavoine, G., Bertrand, I., 2020. Temporal dynamics of litter quality, soil properties and microbial strategies as main drivers of the priming effect. Geoderma 377, 114576. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114576

Fanin, N., Kardol, P., Farrell, M., Nilsson, M.-C., Gundale, M.J., Wardle, D.A., 2019. The ratio of Gram-positive to Gram-negative bacterial PLFA markers as an indicator of carbon availability in organic soils. Soil Biol. Biochem. 128, 111–114. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.10.010

Fontaine, S., Henault, C., Aamor, A., Bdioui, N., Bloor, J.M.G., Maire, V., Mary, B., Revaillot, S., Maron, P.A., 2011. Fungi mediate long term sequestration of carbon and nitrogen in soil through their priming effect. Soil Biol. Biochem. 43, 86–96. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.09.017

Fontaine, S., Mariotti, A., Abbadie, L., 2003. The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? Soil Biol. Biochem. 35, 837–843. https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00123-8

Foster, R.C., 1988. Microenvironments of soil microorganisms. Biol. Fertil. Soils 6, 189–203.

Frey, S.D., 2015. The Spatial Distribution of Soil Biota, in: Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry. ELDOR A. PAUL, pp. 223–272.

Frey, S.D., 2007. Spatial distribution of soil organisms, in: Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry. Elsevier, pp. 283–300. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-047514-1.50015-9

Frey, S.D., Six, J., Elliott, E.T., 2003. Reciprocal transfer of carbon and nitrogen by decomposer fungi at the soil–litter interface. Soil Biol. Biochem. 35, 1001–1004. https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00155-X

Friedlingstein, P., Jones, M.W., O'Sullivan, M., Andrew, R.M., Hauck, J., Peters, G.P., Peters, W., Pongratz, J., Sitch, S., Le Quéré, C., Bakker, D.C.E., Canadell, J.G., Ciais, P., Jackson, R.B., Anthoni, P., Barbero, L., Bastos, A., Bastrikov, V., Becker, M., Bopp, L., Buitenhuis, E., Chandra, N., Chevallier, F., Chini, L.P., Currie, K.I., Feely, R.A., Gehlen, M., Gilfillan, D., Gkritzalis, T., Goll, D.S., Gruber, N., Gutekunst, S., Harris, I., Haverd, V., Houghton, R.A., Hurtt, G., Ilyina, T., Jain, A.K., Joetzjer, E., Kaplan, J.O., Kato, E., Klein Goldewijk, K., Korsbakken, J.I., Landschützer, P., Lauvset, S.K., Lefèvre, N., Lenton, A., Lienert, S., Lombardozzi, D., Marland, G., McGuire, P.C., Melton, J.R., Metzl, N., Munro, D.R., Nabel, J.E.M.S., Nakaoka, S.-I., Neill, C., Omar, A.M., Ono, T., Peregon, A., Pierrot, D., Poulter, B., Rehder, G., Resplandy, L., Robertson, E., Rödenbeck, C., Séférian, R., Schwinger, J., Smith, N., Tans, P.P., Tian, H., Tilbrook, B., Tubiello, F.N., van der Werf, G.R., Wiltshire, A.J., Zaehle, S., 2019. Global Carbon Budget 2019. Earth Syst. Sci. Data 11, 1783–1838. https://doi.org/10.5194/essd-11-1783-2019

Frostegård, Å., E. Bååth, A.Tunlio, 1993. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forest as revealed by phospholipid fatty acid analysis. Soil Biol. Biochem. 25, 723–730.

Frostegård, Å., Tunlid, A., Bååth, E., 2011. Use and misuse of PLFA measurements in soils. Soil Biol. Biochem. 43, 1621–1625. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.11.021

Gaillard, V., Chenu, C., Recous, S., 2003. Carbon mineralisation in soil adjacent to plant residues of contrasting biochemical quality. Soil Biol. Biochem. 35, 93–99.

Gaillard, V., Chenu, C., Recous, S., Richard, G., 1999. Carbon, nitrogen and microbial gradients induced by plant residues decomposing in soil. Eur. J. Soil Sci. 50, 567–578.

Garbout, A., Munkholm, L.J., Hansen, S.B., Petersen, B.M., Munk, O.L., Pajor, R., 2012. The use of PET/CT scanning technique for 3D visualization and quantification of real-time soil/plant interactions. Plant Soil 352, 113–127. https://doi.org/10.1007/s11104-011-0983-8

Gleeson, D.B., Clipson, N., Melville, K., Gadd, G.M., McDermott, F.P., 2005. Characterization of Fungal Community Structure on a Weathered Pegmatitic Granite. Microb. Ecol. 50, 360–368. https://doi.org/10.1007/s00248-005-0198-8

Grundmann, G.L., 2004. Spatial scales of soil bacterial diversity – the size of a clone. FEMS Microbiol. Ecol. 48, 119–127. https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.01.010

Grundmann, G.L., Dechesne, A., Bartoli, F., Flandrois, J.P., Chassé, J.L., Kizungu, R., 2001. Spatial Modeling of Nitrifier Microhabitats in Soil. Soil Sci. Soc. Am. J. 65, 1709–1716. https://doi.org/10.2136/sssaj2001.1709

Guber, A., Kravchenko, A., Razavi, B.S., Uteau, D., Peth, S., Blagodatskaya, E., Kuzyakov, Y., 2018. Quantitative soil zymography: Mechanisms, processes of substrate and enzyme diffusion in porous media. Soil Biol. Biochem. 127, 156–167. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.09.030

Guhr, A., Marzini, C., Borken, W., Poll, C., Matzner, E., 2016. Effect of water redistribution by two distinct saprotrophic fungi on carbon mineralization and nitrogen translocation in dry soil. Soil Biol. Biochem. 103, 380–387. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.09.009

Gutiérrez Castorena, E.V., Gutiérrez-Castorena, Ma. del C., González Vargas, T., Cajuste Bontemps, L., Delgadillo Martínez, J., Suástegui Méndez, E., Ortiz Solorio, C.A., 2016. Micromapping of microbial hotspots and biofilms from different crops using digital image mosaics of soil thin sections. Geoderma 279, 11–21. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2016.05.017

Hapca, S., Baveye, P.C., Wilson, C., Lark, R.M., Otten, W., 2015. Three-dimensional mapping of soil chemical characteristics at micrometric scale by combining 2D SEM-EDX data and 3D X-Ray CT images. PloS One 10, e0137205.

Hapca, S.M., Houston, A.N., Otten, W., Baveye, P.C., 2013. New Local Thresholding Method for Soil Images by Minimizing Grayscale Intra-Class Variance. Vadose Zone J. 12, 0. https://doi.org/10.2136/vzj2012.0172

Harris, K., Crabb, D., Young, I.M., Weaver, H., Gilligan, C.A., Otten, W., Ritz, K., 2002. In situ visualisation of fungi in soil thin sections: problems with crystallisation of the fluorochrome FB 28 (Calcofluor M2R) and improved staining by SCRI Renaissance 2200. Mycol. Res. 106, 293–297. https://doi.org/10.1017/S0953756202005749

Heitkötter, J., Marschner, B., 2018. Soil zymography as a powerful tool for exploring hotspots and substrate limitation in undisturbed subsoil. Soil Biol. Biochem. 124, 210–217. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.06.021

Helliwell, J.R., Miller, A.J., Whalley, W.R., Mooney, S.J., Sturrock, C.J., 2014. Quantifying the impact of microbes on soil structural development and behaviour in wet soils. Soil Biol. Biochem. 74, 138–147. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.03.009

Hemes, S., Desbois, G., Urai, J.L., Schröppel, B., Schwarz, J.-O., 2015. Multi-scale characterization of porosity in Boom Clay (HADES-level, Mol, Belgium) using a combination of X-ray μ-CT, 2D BIB-SEM and FIB-SEM tomography. Microporous Mesoporous Mater. 208, 1–20. https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2015.01.022

Herrmann, A.M., Clode, P.L., Fletcher, I.R., Nunan, N., Stockdale, E.A., O'Donnell, A.G., Murphy, D.V., 2007a. A novel method for the study of the biophysical interface in soils using nano-scale secondary ion mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 21, 29–34. https://doi.org/10.1002/rcm.2811

Herrmann, A.M., Ritz, K., Nunan, N., Clode, P.L., Pett-Ridge, J., Kilburn, M.R., Murphy, D.V., O'Donnell, A.G., Stockdale, E.A., 2007b. Nano-scale secondary ion mass spectrometry — A new analytical tool in biogeochemistry and soil ecology: A review article. Soil Biol. Biochem. 39, 1835–1850. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.03.011

Hobley, E., Steffens, M., Bauke, S.L., Kögel-Knabner, I., 2018. Hotspots of soil organic carbon storage revealed by laboratory hyperspectral imaging. Sci. Rep. 8. https://doi.org/10.1038/s41598-018-31776-w

Houben, M.E., Desbois, G., Urai, J.L., 2013. Pore morphology and distribution in the Shaly facies of Opalinus Clay (Mont Terri, Switzerland): Insights from representative 2D BIB–SEM investigations on mm to nm scale. Appl. Clay Sci. 71, 82–97. https://doi.org/10.1016/j.clay.2012.11.006

Houston, A.N., Schmidt, S., Tarquis, A.M., Otten, W., Baveye, P.C., Hapca, S.M., 2013. Effect of scanning and image reconstruction settings in X-ray computed microtomography on quality and segmentation of 3D soil images. Geoderma 207–208, 154–165. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2013.05.017

Huang, B., Bates, M., Zhuang, X., 2009. Super-Resolution Fluorescence Microscopy. Annu. Rev. Biochem. 78, 993–1016. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061906.092014

Huang, Q., Wu, H., Cai, P., Fein, J.B., Chen, W., 2015. Atomic force microscopy measurements of bacterial adhesion and biofilm formation onto clay-sized particles. Sci. Rep. 5, 16857. https://doi.org/10.1038/srep16857

Iassonov, P., Gebrenegus, T., Tuller, M., 2009. Segmentation of X-ray computed tomography images of porous materials: A crucial step for characterization and quantitative analysis of pore structures: X-RAY CT IMAGE SEGMENTATION. Water Resour. Res. 45. https://doi.org/10.1029/2009WR008087

IPCC, 2013. Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Camb. Univ. Press Camb. U. K. N. Y. USA.

Jacobson, A.R., Dousset, S., Andreux, F., Baveye, P.C., 2007. Electron Microprobe and Synchrotron X-ray Fluorescence Mapping of the Heterogeneous Distribution of Copper in High-Copper Vineyard Soils. Environ. Sci. Technol. 41, 6343–6349. https://doi.org/10.1021/es070707m

Juarez, S., 2013. Thèse: Régulations biotiques et abiotiques de la décomposition des matières organiques des sols. AgroParisTech, Thiverval-grignon.

Juarez, S., Nunan, N., Duday, A.-C., Pouteau, V., Schmidt, S., Hapca, S., Falconer, R., Otten, W., Chenu, C., 2013. Effects of different soil structures on the decomposition of native and added organic carbon. Eur. J. Soil Biol. 58, 81–90.

Juyal, A., Eickhorst, T., Falconer, R., Baveye, P.C., Spiers, A., Otten, W., 2018. Control of Pore Geometry in Soil Microcosms and Its Effect on the Growth and Spread of Pseudomonas and Bacillus sp. Front. Environ. Sci. 6, 73. https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00073

Juyal, A., Otten, W., Falconer, R., Hapca, S., Schmidt, H., Baveye, P.C., Eickhorst, T., 2019. Combination of techniques to quantify the distribution of bacteria in their soil microhabitats at different spatial scales. Geoderma 334, 165–174. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.07.031

Kaestner, A., Lehmann, E., Stampanoni, M., 2008. Imaging and image processing in porous media research. Adv. Water Resour. 31, 1174–1187. https://doi.org/10.1016/j.advwatres.2008.01.022

Kandeler, E., 2007. Physiological and biochemical methods for studying soil biota and their function, in: Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (Third Edition),. Eldor A. Paul, pp. 53–83.

Kandeler, E., 1999. Xylanase, invertase and protease at the soil–litter interface of a loamy sand. Soil Biol. Biochem. 31, 1171–1179. https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00035-8

Kandeler, E., Marschner, P., Tscherko, D., Gahoonia, T.S., Erik, N., 2002. Microbial community composition and functional diversity in the rhizosphere of maize. Plant Soil 238, 301–312.

Karbin, S., Hagedorn, F., Hiltbrunner, D., Zimmermann, S., Niklaus, P.A., 2017. Spatial micro-distribution of methanotrophic activity along a 120-year afforestation chronosequence. Plant Soil 415, 13–23. https://doi.org/10.1007/s11104-016-3141-5

Karnovsky, Morris.J., 1965. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. J. Cell Biol. 27.

Keiluweit, M., Bougoure, J.J., Nico, P.S., Pett-Ridge, J., Weber, P.K., Kleber, M., 2015. Mineral protection of soil carbon counteracted by root exudates. Nat. Clim. Change 5, 588–595. https://doi.org/10.1038/nclimate2580

Kemgue, A.T., Monga, O., Moto, S., Pot, V., Garnier, P., Baveye, P.C., Bouras, A., 2019. From spheres to ellipsoids: Speeding up considerably the morphological modeling of pore space and water retention in soils. Comput. Geosci. 123, 20–37. https://doi.org/10.1016/j.cageo.2018.11.006

Kherlopian, A.R., Song, T., Duan, Q., Neimark, M.A., Po, M.J., Gohagan, J.K., Laine, A.F., 2008. A review of imaging techniques for systems biology. BMC Syst. Biol. 2, 74. https://doi.org/10.1186/1752-0509-2-74

Kilbertus, G., 1980. Microhabitats in soil aggregates. Their relationship with bacterial biomass and the size of the procaryotes present. Rev. Ecol. Biol. Sol 17, 543–557.

Kinyangi, J., Solomon, D., Liang, B., Lerotic, M., Wirick, S., Lehmann, J., 2006. Nanoscale Biogeocomplexity of the Organomineral Assemblage in Soil. Soil Sci. Soc. Am. J. 70, 1708. https://doi.org/10.2136/sssaj2005.0351

Kleber, M., Röner, J., Chenu, C., Glaser, B., Knicker, H., Jahn, R., 2003. Prehistoric alteration of soil properties in a central german chernozemic soil: in search of pedologic indicators for prehistoric activity. Soil Sci. 168, 292–306. https://doi.org/10.1097/01.ss.0000064892.94869.3a

Klute, A., 1986. Water Retention: Laboratory Methods, in: Klute, Arnold (Ed.), SSSA Book Series. Soil Science Society of America, American Society of Agronomy, Madison, WI, USA, pp. 635–662. https://doi.org/10.2136/sssabookser5.1.2ed.c26

Kögel-Knabner, I., 2002. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. Soil Biol. Biochem. 34, 139–162. https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00158-4

Koliji, A., Vulliet, L., Laloui, L., 2010. Structural characterization of unsaturated aggregated soil. Can Geotech 47, 297–311.

Kramer, S., Dibbern, D., Moll, J., Huenninghaus, M., Koller, R., Krueger, D., Marhan, S., Urich, T., Wubet, T., Bonkowski, M., Buscot, F., Lueders, T., Kandeler, E., 2016.

Resource Partitioning between Bacteria, Fungi, and Protists in the Detritusphere of an Agricultural Soil. Front. Microbiol. 7, 1–12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01524

Kubota, K., 2013. CARD-FISH for Environmental Microorganisms: Technical Advancement and Future Applications. Microbes Environ. 28, 3–12. https://doi.org/10.1264/jsme2.ME12107

Kuzyakov, Y., 2010. Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. Soil Biol. Biochem. 42, 1363–1371. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.04.003

Kuzyakov, Y., Blagodatskaya, E., 2015. Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review. Soil Biol. Biochem. 83, 184–199. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.01.025

Kuzyakov, Y., Bol, R., 2006. Sources and mechanisms of priming effect induced in two grassland soils amended with slurry and sugar. Soil Biol. Biochem. 38, 747–758. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.06.025

Kuzyakov, Y., Bol, R., 2004. Using natural13C abundances to differentiate between three CO2 sources during incubation of a grassland soil amended with slurry and sugar. J. Plant Nutr. Soil Sci. 167, 669–677. https://doi.org/10.1002/jpln.200421412

Kuzyakov, Y., Friedel, J.K., Stahr, K., 2000. Review of mechanisms and quantification of priming effects. Soil Biol. Biochem. 1495–1498.

Lal, R., 2019. Conceptual basis of managing soil carbon: Inspired by nature and driven by science. J. Soil Water Conserv. 74, 29A-34A. https://doi.org/10.2489/jswc.74.2.29A

Lal, R., 2008. Sequestration of atmospheric CO2 in global carbon pools. Energy Environ. Sci. 1, 86. https://doi.org/10.1039/b809492f

Landis, E.N., Keane, D.T., 2010. X-ray microtomography. Mater. Charact. 61, 1305–1316. https://doi.org/10.1016/j.matchar.2010.09.012

Larsen, M., Borisov, S.M., Grunwald, B., Klimant, I., Glud, R.N., 2011. A simple and inexpensive high resolution color ratiometric planar optode imaging approach: application to oxygen and pH sensing. Limnol. Oceanogr. Methods 9, 348–360.

Leake, J.R., Donnelly, D.P., Saunders, E.M., Boddy, L., Read, D.J., 2001. Rates and quantities of carbon flux to ectomycorrhizal mycelium following 14C pulse labeling of Pinus sylvestris seedlings: effects of litter patches and interaction with a wood-decomposer fungus. Tree Physiol. 21, 71–82. https://doi.org/10.1093/treephys/21.2-3.71

Lee, N., Nielsen, P.H. er, Andreasen, K. er H., Juretschko, S., Nielsen, J.L., Schleifer, K.-H., Wagner, M., 1999. Combination of fluorescent in situ hybridization and

microautoradiography—a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. Appl. Environ. Microbiol. 65, 1289–1297.

Lehmann, J., Kleber, M., 2015. The contentious nature of soil organic matter. Nature 528, 60–68. https://doi.org/10.1038/nature16069

Lehmann, J., Liang, B., Solomon, D., Lerotic, M., Luizão, F., Kinyangi, J., Schäfer, T., Wirick, S., Jacobsen, C., 2005. Near-edge X-ray absorption fine structure (NEXAFS) spectroscopy for mapping nano-scale distribution of organic carbon forms in soil: Application to black carbon particles: carbon NEXAFS spectroscopy of black carbon particles. Glob. Biogeochem. Cycles 19. https://doi.org/10.1029/2004GB002435

Lehmann, J., Solomon, D., Kinyangi, J., Dathe, L., Wirick, S., Jacobsen, C., 2008. Spatial complexity of soil organic matter forms at nanometre scales. Nat. Geosci. 1, 238–242. https://doi.org/10.1038/ngeo155

Lerch, T.Z., Dignac, M.-F., Nunan, N., Bardoux, G., Barriuso, E., Mariotti, A., 2009. Dynamics of soil microbial populations involved in 2,4-D biodegradation revealed by FAME-based Stable Isotope Probing. Soil Biol. Biochem. 41, 77–85. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.09.020

Li, T., Wu, T.-D., Mazéas, L., Toffin, L., Guerquin-Kern, J.-L., Leblon, G., Bouchez, T., 2008. Simultaneous analysis of microbial identity and function using NanoSIMS. Environ. Microbiol. 10, 580–588. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01478.x

Li, Y., Tuovinen, O.H., Dick, W.A., 2004. Fluorescence microscopy for visualization of soil microorganisms: a review. Biol. Fertil. Soils 39, 301–311. https://doi.org/10.1007/s00374-004-0722-x

Lin, B., Cerato, A.B., 2014. Applications of SEM and ESEM in Microstructural Investigation of Shale-Weathered Expansive Soils along Swelling-Shrinkage Cycles. Eng. Geol. 177, 66–74. https://doi.org/10.1016/j.enggeo.2014.05.006

Lindahl, B., Stenlid, J., Olsson, S., Finlay, R., 1999. Translocation of ^{32} P between interacting mycelia of a wood-decomposing fungus and ectomycorrhizal fungi in microcosm systems. New Phytol. 144, 183–193. https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1999.00502.x

Liu, S., Razavi, B.S., Su, X., Maharjan, M., Zarebanadkouki, M., Blagodatskaya, E., Kuzyakov, Y., 2017. Spatio-temporal patterns of enzyme activities after manure application reflect mechanisms of niche differentiation between plants and microorganisms. Soil Biol. Biochem. 112, 100–109. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.05.006

Lower, S.K., Hochella, M.F., Beveridge, T.J., 2001. Bacterial recognition of mineral surfaces: nanoscale interactions between shewanella and alpha-FeOOH. 2001 292, 1360–1363.

Luo, Z., Wang, E., Smith, C., 2015. Fresh carbon input differentially impacts soil carbon decomposition across natural and managed systems. Ecology 96, 2806–2813. https://doi.org/10.1890/14-2228.1

Luo, Z., Wang, E., Sun, O.J., 2016. A meta-analysis of the temporal dynamics of priming soil carbon decomposition by fresh carbon inputs across ecosystems. Soil Biol. Biochem. 101, 96–103. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.07.011

Ma, X., Razavi, B.S., Holz, M., Blagodatskaya, E., Kuzyakov, Y., 2017. Warming increases hotspot areas of enzyme activity and shortens the duration of hot moments in the root-detritusphere. Soil Biol. Biochem. 107, 226–233. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.01.009

Manzoni, S., Porporato, A., 2009. Soil carbon and nitrogen mineralization: Theory and models across scales. Soil Biol. Biochem. 41, 1355–1379. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.02.031

Maraha, N., Backman, A., Jansson, J.K., 2004. Monitoring physiological status of GFP-tagged Pseudomonas fluorescens SBW25 under different nutrient conditions and in soil by flow cytometry. FEMS Microbiol. Ecol. 51, 123–132. https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.07.007

Marschner, P., Marhan, S., Kandeler, E., 2012. Microscale distribution and function of soil microorganisms in the interface between rhizosphere and detritusphere. Soil Biol. Biochem. 49, 174–183. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.01.033

Marschner, P., Umar, S., Baumann, K., 2011. The microbial community composition changes rapidly in the early stages of decomposition of wheat residue. Soil Biol. Biochem. 43, 445–451. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.11.015

McMahon, S.K., Williams, M.A., Bottomley, P.J., Myrold, D.D., 2005. Dynamics of Microbial Communities during Decomposition of Carbon-13 Labeled Ryegrass Fractions in Soil. Soil Sci. Soc. Am. J. 69, 1238–1247. https://doi.org/10.2136/sssaj2004.0289

McMaster, T.J., 2012. Atomic Force Microscopy of the fungi–mineral interface: applications in mineral dissolution, weathering and biogeochemistry. Curr. Opin. Biotechnol. 23, 562–569. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.05.006

Mizutani, R., Suzuki, Y., 2012. X-ray microtomography in biology. Micron 43, 104–115. https://doi.org/10.1016/j.micron.2011.10.002

Monga, O., Bousso, M., Garnier, P., Pot, V., 2008. 3D geometric structures and biological activity: Application to microbial soil organic matter decomposition in pore space. Ecol. Model. 216, 291–302. https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2008.04.015

Monga, O., Garnier, P., Pot, V., Coucheney, E., Nunan, N., Otten, W., Chenu, C., 2014. Simulating microbial degradation of organic matter in a simple porous system using the 3-D diffusion-based model MOSAIC. Biogeosciences 11, 2201–2209. https://doi.org/10.5194/bg-11-2201-2014

Morgan, P., Cooper, C.J., Battersby, N.S., Lee, S.A., Lewis, T.M., Machin, T.M., Graham, S.C., Watkinson, R.J., 1991. Automated image analysis method to determine fungal biomass in soils and on solid matrices. Soil Biol. Biochem. 23, 609–616.

Moritsuka, N., Yanai, J., Mori, K., Kosaki, T., 2004. Biotic and abiotic processes of nitrogen immobilization in the soil-residue interface. Soil Biol. Biochem. 36, 1141–1148. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.02.024

Moyano, F.E., Manzoni, S., Chenu, C., 2013. Responses of soil heterotrophic respiration to moisture availability: An exploration of processes and models. Soil Biol. Biochem. 59, 72–85. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.01.002

Moyano, F.E., Vasilyeva, N., Bouckaert, L., Cook, F., Craine, J., Curiel Yuste, J., Don, A., Epron, D., Formanek, P., Franzluebbers, A., Ilstedt, U., Kätterer, T., Orchard, V., Reichstein, M., Rey, A., Ruamps, L., Subke, J.-A., Thomsen, I.K., Chenu, C., 2012. The moisture response of soil heterotrophic respiration: interaction with soil properties. Biogeosciences 9, 1173–1182. https://doi.org/10.5194/bg-9-1173-2012

Mueller, C.W., Kölbl, A., Hoeschen, C., Hillion, F., Heister, K., Herrmann, A.M., Kögel-Knabner, I., 2012. Submicron scale imaging of soil organic matter dynamics using NanoSIMS – From single particles to intact aggregates. Org. Geochem. 42, 1476–1488. https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2011.06.003

Mueller, C.W., Weber, P.K., Kilburn, M.R., Hoeschen, C., Kleber, M., Pett-Ridge, J., 2013. Advances in the Analysis of Biogeochemical Interfaces, in: Advances in Agronomy. Elsevier, pp. 1–46. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407685-3.00001-3

Muggia, L., Klug, B., Berg, G., Grube, M., 2013. Localization of bacteria in lichens from Alpine soil crusts by fluorescence in situ hybridization. Appl. Soil Ecol. 68, 20–25. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.03.008

Müller, K., Marhan, S., Kandeler, E., Poll, C., 2017. Carbon flow from litter through soil microorganisms: From incorporation rates to mean residence times in bacteria and fungi. Soil Biol. Biochem. 115, 187–196. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.08.017

Musat, N., Foster, R., Vagner, T., Adam, B., Kuypers, M.M.M., 2012. Detecting metabolic activities in single cells, with emphasis on nanoSIMS. FEMS Microbiol. Rev. 36, 486–511. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00303.x

Myrold, D.D., Pett-Ridge, J., Bottomley, P.J., 2011. Nitrogen Mineralization and Assimilation at Millimeter Scales, in: Methods in Enzymology. Elsevier, pp. 91–114. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386489-5.00004-X

Nannipieri, P., Muccini, L., Ciardi, C., 1983. Microbial biomass and enzyme activities: Production and persistence. Soil Biol. Biochem. 15, 679–685. https://doi.org/10.1016/0038-0717(83)90032-9

Negassa, W.C., Guber, A.K., Kravchenko, A.N., Marsh, T.L., Hildebrandt, B., Rivers, M.L., 2015. Properties of Soil Pore Space Regulate Pathways of Plant Residue Decomposition and Community Structure of Associated Bacteria. PLOS ONE 10, e0123999. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123999

Nicolardot, B., Bouziri, L., Bastian, F., Ranjard, L., 2007. A microcosm experiment to evaluate the influence of location and quality of plant residues on residue decomposition and genetic structure of soil microbial communities. Soil Biol. Biochem. 39, 1631–1644. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.01.012

Nubel, U., Bateson, M.M., Vandieken, V., Wieland, A., Kuhl, M., Ward, D.M., 2002. Microscopic Examination of Distribution and Phenotypic Properties of Phylogenetically Diverse Chloroflexaceae-Related Bacteria in Hot Spring Microbial Mats. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4593–4603. https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4593-4603.2002

Nunan, N., Daniell, T.J., Singh, B.K., Papert, A., McNicol, J.W., Prosser, J.I., 2005. Links between Plant and Rhizoplane Bacterial Communities in Grassland Soils, Characterized Using Molecular Techniques. Appl. Environ. Microbiol. 71, 6784–6792. https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6784-6792.2005

Nunan, N., Leloup, J., Ruamps, L.S., Pouteau, V., Chenu, C., 2017. Effects of habitat constraints on soil microbial community function. Sci. Rep. 7, 4280. https://doi.org/10.1038/s41598-017-04485-z

Nunan, N., Ritz, K., Crabb, D., Harris, K., Wu, K., Crawford, J.W., Young, I.M., 2001. Quantification of the in situ distribution of soil bacteria by large-scale imaging of thin sections of undisturbed soil. FEMS Microbiol. Ecol. 36, 66–77.

Nunan, N., Wu, K., Young, I.M., Crawford, J.W., Ritz, K., 2003. Spatial distribution of bacterial communities and their relationships with the micro-architecture of soil. FEMS Microbiol. Ecol. 44, 203–215. https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00027-8

Nunan, N., Wu, K., Young, I.M., Crawford, J.W., Ritz, K., 2002. In Situ Spatial Patterns of Soil Bacterial Populations, Mapped at Multiple Scales, in an Arable Soil. Microb. Ecol. 44, 296–305. https://doi.org/10.1007/s00248-002-2021-0

Ouverney, C.C., Fuhrman, J.A., 1999. Combined microautoradiography–16S rRNA probe technique for determination of radioisotope uptake by specific microbial cell types in situ. Appl. Environ. Microbiol. 65, 1746–1752.

Pascault, N., Nicolardot, B., Bastian, F., Thiébeau, P., Ranjard, L., Maron, P.-A., 2010. In Situ Dynamics and Spatial Heterogeneity of Soil Bacterial Communities Under Different Crop Residue Management. Microb. Ecol. 60, 291–303. https://doi.org/10.1007/s00248-010-9648-z

Pascault, N., Ranjard, L., Kaisermann, A., Bachar, D., Christen, R., Terrat, S., Mathieu, O., Lévêque, J., Mougel, C., Henault, C., Lemanceau, P., Péan, M., Boiry, S., Fontaine, S., Maron, P.-A., 2013. Stimulation of Different Functional Groups of Bacteria by Various Plant Residues as a Driver of Soil Priming Effect. Ecosystems 16, 810–822. https://doi.org/10.1007/s10021-013-9650-7

Pedersen, L.L., Smets, B.F., Dechesne, A., 2015. Measuring biogeochemical heterogeneity at the micro scale in soils and sediments. Soil Biol. Biochem. 90, 122–138. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.08.003

Peth, S., Chenu, C., Leblond, N., Mordhorst, A., Garnier, P., Nunan, N., Pot, V., Ogurreck, M., Beckmann, F., 2014. Localization of soil organic matter in soil aggregates using synchrotron-based X-ray microtomography. Soil Biol. Biochem. 78, 189–194. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.07.024

Peth, S., Horn, R., Beckmann, F., Donath, T., Fischer, J., Smucker, A.J.M., 2008. Three-Dimensional Quantification of Intra-Aggregate Pore-Space Features using Synchrotron-Radiation-Based Microtomography. Soil Sci. Soc. Am. J. 72, 897. https://doi.org/10.2136/sssaj2007.0130

Piccolo, A., 2001. The supramolecular structure of humic substances. Soil Sci. 166, 810–832. https://doi.org/10.1097/00010694-200111000-00007

Piccolo, A., 1996. Humus and Soil Conservation, in: Piccolo, A. (Ed.), Humic Substances in Terrestrial Ecosystems. Elsevier Science B.V., pp. 225–264. https://doi.org/10.1016/B978-044481516-3/50006-2

Pinheiro, M., Garnier, P., Beguet, J., Martin Laurent, F., Vieublé Gonod, L., 2015. The millimetre-scale distribution of 2,4-D and its degraders drives the fate of 2,4-D at the soil core scale. Soil Biol. Biochem. 88, 90–100. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.05.008

Pinheiro, M., Pagel, H., Poll, C., Ditterich, F., Garnier, P., Streck, T., Kandeler, E., Vieublé Gonod, L., 2018. Water flow drives small scale biogeography of pesticides and bacterial pesticide degraders - A microcosm study using 2,4-D as a model compound. Soil Biol. Biochem. 127, 137–147. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.09.024

Pohlmeier, A., Oros-Peusquens, A., Javaux, M., Menzel, M.I., Vanderborght, J., Kaffanke, J., Romanzetti, S., Lindenmair, J., Vereecken, H., Shah, N.J., 2008. Changes in Soil Water Content Resulting from Root Uptake Monitored by Magnetic Resonance Imaging. Vadose Zone J. 7, 1010. https://doi.org/10.2136/vzj2007.0110

Poll, C., Brune, T., Begerow, D., Kandeler, E., 2010. Small-scale Diversity and Succession of Fungi in the Detritusphere of Rye Residues. Microb. Ecol. 59, 130–140. https://doi.org/10.1007/s00248-009-9541-9

Poll, C., Ingwersen, J., Stemmer, M., Gerzabek, M.H., Kandeler, E., 2006. Mechanisms of solute transport affect small-scale abundance and function of soil microorganisms in the detritusphere. Eur. J. Soil Sci. 57, 583–595. https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2006.00835.x

Poll, C., Marhan, S., Ingwersen, J., Kandeler, E., 2008. Dynamics of litter carbon turnover and microbial abundance in a rye detritusphere. Soil Biol. Biochem. 40, 1306–1321. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.04.002

Portell, X., Pot, V., Garnier, P., Otten, W., Baveye, P.C., 2018. Microscale Heterogeneity of the Spatial Distribution of Organic Matter Can Promote Bacterial Biodiversity in Soils: Insights From Computer Simulations. Front. Microbiol. 9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01583

Postma, J., Altemüller, H.-J., 1990. Bacteria in thin soil sections stained with the fluorescent brightener calcofluor white M2R. Soil Biol. Biochem. 22, 89–96. https://doi.org/10.1016/0038-0717(90)90065-8

Pot, V., Peth, S., Monga, O., Vogel, L.E., Genty, A., Garnier, P., Vieublé-Gonod, L., Ogurreck, M., Beckmann, F., Baveye, P.C., 2015. Three-dimensional distribution of water and air in soil pores: Comparison of two-phase two-relaxation-times lattice-Boltzmann and morphological model outputs with synchrotron X-ray computed

tomography data. Adv. Water Resour. 84, 87–102. https://doi.org/10.1016/j.advwatres.2015.08.006

Pulleman, M., Tietema, A., 1999. Microbial C and N transformations during drying and rewetting of coniferous forest floor material. Soil Biol. Biochem. 11.

Quideau, S.A., McIntosh, A.C.S., Norris, C.E., Lloret, E., Swallow, M.J.B., Hannam, K., 2016. Extraction and Analysis of Microbial Phospholipid Fatty Acids in Soils. J. Vis. Exp. e543360. https://doi.org/10.3791/54360

Ranjard, L., Richaume, A., 2001. Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. Res. Microbiol. 152, 707–716.

Raynaud, X., Nunan, N., 2014. Spatial Ecology of Bacteria at the Microscale in Soil. PLoS ONE 9, e87217. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087217

Razavi, B.S., Zarebanadkouki, M., Blagodatskaya, E., Kuzyakov, Y., 2016. Rhizosphere shape of lentil and maize: Spatial distribution of enzyme activities. Soil Biol. Biochem. 96, 229–237. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.02.020

Razavi, B.S., Zhang, X., Bilyera, N., Guber, A., Zarebanadkouki, M., 2019. Soil zymography: Simple and reliable? Review of current knowledge and optimization of the method. Rhizosphere 11, 100161. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2019.100161

Reeves, J.B., 2010. Near- versus mid-infrared diffuse reflectance spectroscopy for soil analysis emphasizing carbon and laboratory versus on-site analysis: Where are we and what needs to be done? Geoderma 158, 3–14. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2009.04.005

Reichardt, W., Briones, A., de Jesus, R., Padre, B., 2001. Microbial population shifts in experimental rice systems. Appl. Soil Ecol. 17, 151–163. https://doi.org/10.1016/S0929-1393(01)00122-6

Remusat, L., Hatton, P.-J., Nico, P.S., Zeller, B., Kleber, M., Derrien, D., 2012. NanoSIMS Study of Organic Matter Associated with Soil Aggregates: Advantages, Limitations, and Combination with STXM. Environ. Sci. Technol. 46, 3943–3949. https://doi.org/10.1021/es203745k

Ritz, K., Young, I.M., 2004. Interactions between soil structure and fungi. Mycologist 18, 52–59. https://doi.org/10.1017/S0269915X04002010

Rogers, S.W., Moorman, T.B., Ong, S.K., 2007. Fluorescent In Situ Hybridization and Micro-autoradiography Applied to Ecophysiology in Soil. Soil Sci. Soc. Am. J. 71, 620. https://doi.org/10.2136/sssaj2006.0105

Roose, T., Keyes, S.D., Daly, K.R., Carminati, A., Otten, W., Vetterlein, D., Peth, S., 2016. Challenges in imaging and predictive modeling of rhizosphere processes. Plant Soil 407, 9–38. https://doi.org/10.1007/s11104-016-2872-7

Ruamps, L.S., Nunan, N., Chenu, C., 2011. Microbial biogeography at the soil pore scale. Soil Biol. Biochem. 43, 280–286. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.10.010

Rudolph, N., Esser, H.G., Carminati, A., Moradi, A.B., Hilger, A., Kardjilov, N., Nagl, S., Oswald, S.E., 2012. Dynamic oxygen mapping in the root zone by fluorescence dye imaging combined with neutron radiography. J. Soils Sediments 12, 63–74. https://doi.org/10.1007/s11368-011-0407-7

Rudolph-Mohr, N., Gottfried, S., Lamshöft, M., Zühlke, S., Oswald, S.E., Spiteller, M., 2015. Non-invasive imaging techniques to study O2 micro-patterns around pesticide treated lupine roots. Geoderma 239–240, 257–264. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2014.10.022

Sanaullah, M., Razavi, B.S., Blagodatskaya, E., Kuzyakov, Y., 2016. Spatial distribution and catalytic mechanisms of β-glucosidase activity at the root-soil interface. Biol. Fertil. Soils 52, 505–514. https://doi.org/10.1007/s00374-016-1094-8

Schlüter, S., Eickhorst, T., Mueller, C.W., 2019. Correlative Imaging Reveals Holistic View of Soil Microenvironments. Environ. Sci. Technol. 53, 829–837. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05245

Schmidt, H., Eickhorst, T., 2014. Detection and quantification of native microbial populations on soil-grown rice roots by catalyzed reporter deposition-fluorescence *in situ* hybridization. FEMS Microbiol. Ecol. 87, 390–402. https://doi.org/10.1111/1574-6941.12232

Schmidt, H., Eickhorst, T., Mußmann, M., 2012. Gold-FISH: A new approach for the in situ detection of single microbial cells combining fluorescence and scanning electron microscopy. Syst. Appl. Microbiol. 35, 518–525. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.04.006

Schmidt, H., Nunan, N., Höck, A., Eickhorst, T., Kaiser, C., Woebken, D., Raynaud, X., 2018. Recognizing Patterns: Spatial Analysis of Observed Microbial Colonization on Root Surfaces. Front. Environ. Sci. 6, 61. https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00061

Schmidt, M.W.I., Knicker, H., Hatcher, P.G., Kogel-Knabner, I., 1997. Improvement of 13C and 15N CPMAS NMR spectra of bulk soils, particle size fractions and organic material by treatment with 10% hydrofluoric acid. Eur. J. Soil Sci. 48, 319–328. https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.1997.tb00552.x

Schurig, C., Mueller, C.W., Höschen, C., Prager, A., Kothe, E., Beck, H., Miltner, A., Kästner, M., 2015. Methods for visualising active microbial benzene degraders in in situ microcosms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99, 957–968. https://doi.org/10.1007/s00253-014-6037-4

Singh, B., Gräfe, M. (Eds.), 2010. Synchrotron-based techniques in soils and sediments, Developments in soil science. Elsevier, Amsterdam.

Six, J., Conant, R.T., Paul, E.A., Paustian, K., 2002. Stabilization mechanisms of soil organic matter: Implications for C-saturation of soils. Plant Soil 241, 155–176.

Sleutel, S., Bouckaert, L., Buchan, D., Van Loo, D., Cornelis, W.M., Sanga, H.G., 2012. Manipulation of the soil pore and microbial community structure in soil mesocosm incubation studies. Soil Biol. Biochem. 45, 40–48. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.09.016

Sollins, P., Homann, P., Caldwell, B.A., 1996. Stabilization and destabilization of soil organic matter: mechanisms and controls. Geoderma 74, 65–105. https://doi.org/10.1016/S0016-7061(96)00036-5

Solomon, D., Lehmann, J., Wang, J., Kinyangi, J., Heymann, K., Lu, Y., Wirick, S., Jacobsen, C., 2012. Micro- and nano-environments of C sequestration in soil: A multi-elemental STXM–NEXAFS assessment of black C and organomineral associations. Sci. Total Environ. 438, 372–388. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.071

Spohn, M., Carminati, A., Kuzyakov, Y., 2013. Soil zymography – A novel in situ method for mapping distribution of enzyme activity in soil. Soil Biol. Biochem. 58, 275–280. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.12.004

Spohn, M., Kuzyakov, Y., 2014. Spatial and temporal dynamics of hotspots of enzyme activity in soil as affected by living and dead roots—a soil zymography analysis. Plant Soil 379, 67–77. https://doi.org/10.1007/s11104-014-2041-9

Spohn, M., Kuzyakov, Y., 2013. Distribution of microbial- and root-derived phosphatase activities in the rhizosphere depending on P availability and C allocation – Coupling soil zymography with 14C imaging. Soil Biol. Biochem. 67, 106–113. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.08.015

Steffens, M., Buddenbaum, H., 2013. Laboratory imaging spectroscopy of a stagnic Luvisol profile — High resolution soil characterisation, classification and mapping of elemental concentrations. Geoderma 195–196, 122–132. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2012.11.011

Stockmann, U., Adams, M.A., Crawford, J.W., Field, D.J., Henakaarchchi, N., Jenkins, M., Minasny, B., McBratney, A.B., Courcelles, V. de R. de, Singh, K., Wheeler, I., Abbott, L., Angers, D.A., Baldock, J., Bird, M., Brookes, P.C., Chenu, C., Jastrow, J.D., Lal, R., Lehmann, J., O'Donnell, A.G., Parton, W.J., Whitehead, D., Zimmermann, M., 2013. The knowns, known unknowns and unknowns of sequestration of soil organic carbon. Agric. Ecosyst. Environ. 164, 80–99. https://doi.org/10.1016/j.agee.2012.10.001

Stott, D.E., Elliott, L.F., Papendick, R.I., Campbell, G.S., 1986. Low temperature or low water potential effects on the microbial decomposition of wheat residue. Soil Biol Biochem 18, 577–582.

Strong, D.T., Wever, H.D., Merckx, R., Recous, S., 2004. Spatial location of carbon decomposition in the soil pore system. Eur. J. Soil Sci. 55, 739–750. https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2004.00639.x

Thévenaz, P., Unser, M., 2007. User-friendly semiautomated assembly of accurate image mosaics in microscopy. Microsc. Res. Tech. 70, 135–146. https://doi.org/10.1002/jemt.20393

Thies, J.E., 2015. Molecular Approaches to Studying the Soil Biota, in: Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry. Elsevier, pp. 151–185. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415955-6.00006-2

Thiet, R.K., Frey, S.D., Six, J., 2006. Do growth yield efficiencies differ between soil microbial communities differing in fungal:bacterial ratios? Reality check and methodological issues. Soil Biol. Biochem. 38, 837–844. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.07.010

Tippkötter, R., Ritz, K., 1996. Evaluation of polyester, epoxy and acrylic resins for suitability in preparation of soil thin sections for in situ biological studies. Geoderma 69, 31–57.

Tippkötter, R., Ritz, K., Darbyshire, J.F., 1986. The preparation of soil thin sections for biological studies. J. Soil Sci. 37, 681–690.

Tisdall, J., Cockroft, B., Uren, N., 1978. The stability of soil aggregates as affected by organic materials, microbial activity and physical disruption. Soil Res. 16, 9. https://doi.org/10.1071/SR9780009

Torsvik, V., Daae, F.L., Sandaa, R.-A., Øvreås, L., 1998. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. J. Biotechnol. 64, 53–62.

Torsvik, V., Øvreås, L., 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. Curr. Opin. Microbiol. 5, 240–245.

Tracy, S.R., Daly, K.R., Sturrock, C.J., Crout, N.M.J., Mooney, S.J., Roose, T., 2015. Three-dimensional quantification of soil hydraulic properties using X-ray Computed Tomography and image-based modeling. Water Resour. Res. 51, 1006–1022. https://doi.org/10.1002/2014WR016020

Treves, D.S., Xia, B., Zhou, J., Tiedje, J.M., 2003. A two-species test of the hypothesis that spatial isolation influences microbial diversity in soil. Microb. Ecol. 45, 20–28. https://doi.org/10.1007/s00248-002-1044-x

Turkowyd, B., Virant, D., Endesfelder, U., 2016. From single molecules to life: microscopy at the nanoscale. Anal. Bioanal. Chem. 408, 6885–6911. https://doi.org/10.1007/s00216-016-9781-8

Uhlířová, E, Elhottovà, D, Triska, J, Santruckova, H, 2005. Physiology and Microbial Community Structure in Soil at Extreme Water Content. Folia Microbiol 50, 161–166.

Van Gestel, M., Merckx, R., Vlassak, K., 1993a. Microbial biomass and activity in soils with fluctuating water contents. Geoderma 56, 617–626.

Van Gestel, M., Merckx, R., Vlassak, K., 1993b. Microbial biomass responses to soil drying and rewetting: The fate of fast- and slow-growing microorganisms in soils from different climates. Soil Biol. Biochem. 25, 109–123. https://doi.org/10.1016/0038-0717(93)90249-B

Van Loo, D., Bouckaert, L., Leroux, O., Pauwels, E., Dierick, M., Van Hoorebeke, L., Cnudde, V., De Neve, S., Sleutel, S., 2014. Contrast agents for soil investigation with X-ray computed tomography. Geoderma 213, 485–491. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2013.08.036

Vargas, R., Hattori, T., 1986. Protozoan predation of bacterial cells in soil aggregates. FEMS Microbiol. Ecol. 38, 233–242.

Védère, C., Vieublé Gonod, L., Pouteau, V., Girardin, C., Chenu, C., 2020. Spatial and temporal evolution of detritusphere hotspots at different soil moistures. Soil Biol. Biochem. 150, 107975. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107975

Vidal, A., Hirte, J., Bender, S.F., Mayer, J., Gattinger, A., Höschen, C., Schädler, S., Iqbal, T.M., Mueller, C.W., 2018. Linking 3D Soil Structure and Plant-Microbe-Soil Carbon Transfer in the Rhizosphere. Front. Environ. Sci. 6. https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00009

Vidal, A., Remusat, L., Watteau, F., Derenne, S., Quenea, K., 2016. Incorporation of 13C labelled shoot residues in Lumbricus terrestris casts: A combination of transmission

electron microscopy and nanoscale secondary ion mass spectrometry. Soil Biol. Biochem. 93, 8–16. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.10.018

Villemin, G., Mansot, J.L., Watteau, F., Ghanbaja, J., Toutain, F., 1995. Study of the biodegradation and humification of soil organic matter of plant origin by Electron Energy Loss Spectroscopy (EELS): distribution of carbon, nitrogen and C:N evaluation at ultrastructural level in situ. Comptes Rendus Acad. Sci. Ser. 2a Sci. Terre Planetes 321, 861–868.

Villemin, G., Toutain, F., 1987. Méthode de fixation d'échantillons organo-minéraux des sols pour la microscopie électronique à transmission. Presented at the N. Fedoroff, L.M. Bresson, M.A. Courty (Eds.), Soil Micromorphology. Proc. VIIth Int. Work. Meet. Soil Micromorphology. A.F.E.S., Plaisir, France, Association francaise étude sols, Plaisir, France, pp. 43–48.

Vogel, H.-J., Roth, K., 2001. Quantitative morphology and network representation of soil pore structure. Adv. Water Resour. 24, 233–242. https://doi.org/10.1016/S0309-1708(00)00055-5

Von Lützow, M., Kögel-Knabner, I., Ludwig, B., Matzner, E., Flessa, H., Ekschmitt, K., Guggenberger, G., Marschner, B., Kalbitz, K., 2008. Stabilization mechanisms of organic matter in four temperate soils: Development and application of a conceptual model. J. Plant Nutr. Soil Sci. 171, 111–124. https://doi.org/10.1002/jpln.200700047

Voroney, R.P., Heck, R.J., 2015. The soil habitat, in: Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry. Elsevier, pp. 15–40.

Vos, M., Wolf, A.B., Jennings, S.J., Kowalchuk, G.A., 2013. Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil. FEMS Microbiol. Rev. 37, 936–954. https://doi.org/10.1111/1574-6976.12023

Watt, M., Hugenholtz, P., White, R., Vinall, K., 2006. Numbers and locations of native bacteria on field-grown wheat roots quantified by fluorescence in situ hybridization (FISH). Environ. Microbiol. 8, 871–884. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00973.x

Watteau, F., Villemin, G., Bartoli, F., Schwartz, C., Morel, J.L., 2012. 0–20 μm aggregate typology based on the nature of aggregative organic materials in a cultivated silty topsoil. Soil Biol. Biochem. 46, 103–114. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.11.021

Watteau, F., Villemin, G., Ghanbaja, J., Genet, P., Pargney, J.-C., 2002. In situ ageing of fine beech roots (Fagus sylvatica) assessed by transmission electron microscopy and

electron energy loss spectroscopy: description of microsites and evolution of polyphenolic substances. Biol. Cell 94, 55–63.

Watteau, F., Villemin, G., Mansot, J.L., Ghanbaja, J., Toutain, F., 1996. Localization and characterization by electron energy loss spectroscopy (EELS) of the brown cellular substances of beech roots. Soil Biol Biochem 28, 1327–1332.

Woignier, T., Braudeau, E., Doumenc, H., Rangon, L., 2005. Supercritical Drying Applied to Natural "Gels": Allophanic Soils. J. Sol-Gel Sci. Technol. 36, 61–68. https://doi.org/10.1007/s10971-005-2659-4

Woignier, T., Primera, J., Duffours, L., Dieudonné, P., Raada, A., 2008. Preservation of the allophanic soils structure by supercritical drying. Microporous Mesoporous Mater. 109, 370–375. https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2007.05.019

Wu, B., 2014. Visualization of nutrient translocation in ectomycorrhizal symbioses. Botany 92, 129–133. https://doi.org/10.1139/cjb-2013-0093

Young, I.M., Crawford, J.W., Nunan, N., Otten, W., Spiers, A., 2008. Chapter 4 Microbial Distribution in Soils, in: Advances in Agronomy. Elsevier, pp. 81–121. https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)00604-4

Yuste, J.C., Peñuelas, J., Estiarte, M., Garcia-Mas, J., Mattana, S., Ogaya, R., Pujol, M., Sardans, J., 2011. Drought-resistant fungi control soil organic matter decomposition and its response to temperature. Glob. Change Biol. 17, 1475–1486. https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02300.x

Zhang, Y., Zheng, N., Wang, J., Yao, H., Qiu, Q., Chapman, S.J., 2019. High turnover rate of free phospholipids in soil confirms the classic hypothesis of PLFA methodology. Soil Biol. Biochem. 135, 323–330. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.05.023

Zogg, G.P., Zak, D.R., Ringelberg, D.B., White, D.C., MacDonald, N.W., Pregitzer, K.S., 1997. Compositional and Functional Shifts in Microbial Communities Due to Soil Warming. Soil Sci. Soc. Am. J. 61, 475. https://doi.org/10.2136/sssaj1997.03615995006100020015x

ÉCOLE DOCTORALE
Agriculture, alimentation, biologie, environnement, santé (ABIES)

Titre : Impact du potentiel matriciel sur la biodégradation de résidus végétaux - Évolution spatio-temporelle de la détritusphère

Mots clés : Biodégradation, Détritusphère, Cycle du carbone, Hétérogénéité spatiale, Habitat microbien, Résidus végétaux

Résumé : En raison de la distribution spatiale hétérogène des micro-organismes et des substrats dans le sol la biodégradation se produit principalement dans des hotspots, comme dans la détritusphère. Connaître les caractéristiques du volume de sol impliqué dans la décomposition d'un substrat organique donné aiderait à comprendre et à prédire leur biodégradation. Nos objectifs étaient: (i) d'identifier le volume de sol impliqué dans la biodégradation de résidus végétaux et (ii) de déterminer dans quelle mesure ce volume est affecté par l'humidité du sol en conditions diffusives. Nous avons incubé des cosmes de sol remaniés comprenant une couche centrale de résidus de maïs marqués ^{13}C à trois potentiels matriciels contrastés. Nous avons effectué un suivi de la minéralisation du résidue et du priming effect sur 601 jours à l'échelle des cosmes. Nous avons analysé le ^{13}C, la structure de la communauté microbienne et son activité dans des coupes de sol millimétriques de distances croissantes aux résidus pour 4 dates d'incubation et avons préparé de lames minces pour des observations microscopiques. La minéralisation et le priming effect augmentent avec l'humidité du sol avant 70 jours d'incubation, mais deviennent tous les deux plus importants que ce qui était attendu en conditions sèches au-delà. Une détritusphère de quelques mm d'épaisseur s'établit d'autant plus rapidement que l'humidité du sol augmente mais sans impact sur la taille de celle-ci. Les communautés microbienne dégradantes étaient différentes des communautés totales mais similaires en conditions humides et sèches. La distribution des microorganismes semblent peu affectée par la teneur en eau mais les gradients de répartition des microorganismes autour des macropores étaient plus forts en conditions sèches qu'humides et au contact du résidu. Il semble plus généralement que dans le cas du sol sec une partie des processus soient plus lents mais leur intensité n'en est pas pour autant amoindrie.

Title : Impact of matric potential on plant residues biodegradation – Spatial andtemporal evolution of the detritusphere

Keywords : Biodegradation, Detritusphere, Carbon cycle, Spatial heterogeneity, microbial habitat, plant residues

Abstract : As a result of the heterogeneous distribution of microorganisms and substrates in soil, biodegradation occurs mainly in hot-spots, such as in the detritusphere. Knowing the characteristics of the volume of soil involved in decomposition of a given organic substrate would help understand and predict biodegradation. Our objectives were: (i) to identify the volume of soil involved in the biodegradation of plant residues and (ii) to determine to what extent this volume is affected by soil moisture under diffusive conditions. We incubated repacked soil cores, with a central layer of ^{13}C labelled maize residues at three contrasted matric potentials. We monitored mineralisation of the residue and priming effect during 601 days at the cosms scale. We analysed ^{13}C, microbial community structure and its activity in soil slices (mm scale) at increasing distances from the residue but also prepared thin sections for microscale observations. Mineralisation and priming effect increased with soil moisture before 70 days of incubation, but they both become higher than expected in dry conditions after. A few mm thick detritusphere was established as fast as the soil humidity was important with no effect on its size. The degrading microbial communities were different from the total communities but similar in wet and dry conditions. The distribution of microorganisms seems little affected by water content, but distribution gradients of microorganisms around the macropores were stronger in dry than wet conditions and in contact with the residue. It seems more generally that in the case of dry soil, part of the processes are slower, however, their intensity is not lessened.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France