

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
CENTRE ARMAND-FRAPPIER SANTÉ TECHNOLOGIE

**Effet de la manipulation de la biodiversité microbienne sur les
processus d'oxydation des gaz traces dans le sol**

Par

Julien SAAVEDRA-LAVOIE

Baccalauréat en sciences biologiques

Mémoire présenté pour obtenir le grade de

Maître ès sciences, M.Sc.

Maîtrise en microbiologie appliquée

04/2019

Ce mémoire intitulé

**Effet de la manipulation de la biodiversité microbienne sur les
processus d'oxydation des gaz traces dans le sol**

et présenté par

Julien SAAVEDRA-LAVOIE

a été évalué par un jury composé de

M. Philippe CONSTANT, directeur de recherche, INRS

M. Claude GUERTIN, examinateur interne, INRS

M. Sébastien ROY, examinateur externe, Université de Sherbrooke

All type of knowledge ultimately means self knowledge

-Bruce lee

RÉSUMÉ

La protection de la biodiversité vise à supporter le fonctionnement des écosystèmes ainsi que les biens et services qu'ils procurent. La relation entre la biodiversité et la fonctionnalité demeure néanmoins complexe, surtout à l'échelle des microorganismes qui sont dotés d'une forte redondance fonctionnelle. Ce projet a été élaboré afin d'évaluer la susceptibilité de quatre fonctions à une altération de la biodiversité microbienne du sol. Ces fonctions comprenaient deux fonctions généralistes, soient le profil d'utilisation de diverses sources de carbone organique et la respiration du dioxyde de carbone (CO₂), et deux fonctions spécialistes, soient l'oxydation du dihydrogène (H₂) et l'oxydation du monoxyde de carbone (CO). Une manipulation de la biodiversité fut réalisée par trois différents rapports d'un mélange de sol forestier non stérile : stérile (1:4, 1:20 et 1:40), en présence ou non de deux antibiotiques. Les microcosmes de sol ont été incubés sous atmosphère contrôlée, assurant la disponibilité de l'H₂ et du CO durant leur colonisation par les microorganismes. Le séquençage d'amplicons de PCR du gène codant pour l'ARNr 16S des bactéries a montré que la composition, et non la richesse spécifique des communautés microbiennes avait été influencée par les traitements. Malgré l'absence d'extinction d'espèce, les fonctions spécialisées ont diminué avec des baisses atteignant 94% par rapport au sol non dilué, alors que les fonctions généralistes n'ont pas été atténuées. Ces résultats montrent la complexité du fonctionnement des écosystèmes tout en proposant l'analyse de la susceptibilité des guildes microbiennes fonctionnelles à une altération de la biodiversité pour élaborer nouveaux outils de protection de l'environnement.

Mots-clés : Écologie microbienne; gaz traces; microbiologie; dihydrogène; monoxyde de carbone.

AVANT-PROPOS

Ce mémoire est présenté sous forme d'article, avec un premier chapitre correspondant à une revue de littérature détaillée présentant le sujet d'étude, suivi par un deuxième chapitre présentant l'article scientifique ayant été réalisé sur la base des travaux en laboratoire effectué au cours du programme de maître en microbiologie appliquée. Une brève conclusion est finalement présentée pour présenter quelques perspectives de recherches découlant des travaux.

REMERCIEMENTS

En premier lieu, j'aimerais remercier mon directeur de recherche Philippe Constant pour son support et son appui tout au long de ma maîtrise. Outre sa rigueur scientifique et son souci de l'excellence, son empathie, mais surtout son écoute fait de lui une personne qui m'inspire autant sur le plan humain que scientifique. Merci pour ta patience et ta confiance qui m'ont permis de m'épanouir scientifiquement et d'apprendre à me poser une multitude de questions autant pertinentes qu'intéressantes tout en ayant les outils me permettant d'aller trouver les réponses. Ensuite, je ne saurais passer sous silence la chance que j'ai eue de participer à des réunions de laboratoire hebdomadaires où se trouvent 4 professeurs : Philippe, Claude, Richard et Isabelle, qui nous partagent leur professionnalisme ainsi que leur savoir-faire, qui pour moi, vaut de l'or, ces réunions sont constructives par leur sérieux, tout en ayant une pointe d'humour de temps en temps. J'aimerais ajouter un merci spécial à Claude Guertin avec qui j'ai eu la chance d'aller échantillonner pour le projet canneberge, et sans qui j'aurais probablement passé toute une journée afin de réussir à trouver un seul plant parmi tous ces stolons, j'ai vraiment hâte de travailler en plus étroite collaboration avec toi dans le cadre de mes études doctorales. Je tiens aussi à remercier tous les étudiants ayant partagé le même local que moi : Alexandra, Anne, Asma, Audrey-Anne, Josiann, Judith, Livie, Mondher, Narin, Rose, Thibault et Valérie. Je considère que ma maturité scientifique a augmenté suite aux conversations que j'ai eues avec chacun d'entre vous et j'ai apprécié chaque instant à vos côtés. Je remercie aussi toutes les personnes avec qui j'ai eu des échanges intéressants dans le cadre de mon séjour à l'INRS-IAF, la science est vraiment un travail d'équipe! J'aimerais aussi remercier mon petit frère Hugo, de qui je considère ayant eu une maturation scientifique plus rapide que la mienne et sur qui je sais que je pourrai toujours compter. Finalement, je remercie ma compagne Catherine pour sa présence tout au long de mon parcours, pour les nuits où elle était là pour moi lorsque je faisais de l'insomnie avant une présentation, pour ses encouragements, son support et son amour, tu es ma meilleure amie et je t'aime!

TABLE DES MATIÈRES

Liste des tableaux	ix
Liste des figures	ix
Liste des abréviations et des sigles	x
Chapitre 1 : Introduction	12
1.1 La biodiversité du sol.....	14
1.1.1 <i>La biodiversité</i>	15
1.1.2 <i>Diversité bêta</i>	17
1.1.3 <i>Diversité fonctionnelle et l'importance de mesurer les fonctions</i>	18
1.2 Le sol et les perturbations anthropogéniques.....	19
1.3 Étude de la biodiversité et du fonctionnement des écosystèmes (BEF).....	20
1.3.1 <i>Mécanismes expliquant les BEF</i>	22
1.3.2 <i>Disproportion entre abondance et fonctionnalité</i>	23
1.4 Contexte de l'étude.....	24
Chapitre 2: Article scientifique	26
2.1 Contribution à l'article.....	26
2.2 Résumé.....	26
2.3 Abstract.....	27
2.4 Introduction.....	28
2.5 Material and methods.....	29
2.5.1 <i>Soil samples</i>	29
2.5.2 <i>Preparation and incubation of soil microcosms</i>	30
2.5.3 <i>Measurement of microbial processes</i>	31
2.5.4 <i>DNA extraction</i>	31
2.5.5 <i>qPCR of bacterial 16S rRNA gene</i>	32
2.5.6 <i>PCR amplicon sequencing of bacterial 16S rRNA gene</i>	32
2.5.7 <i>Statistical analysis</i>	34

2.6 Results.....	35
2.6.1 <i>Microbial processes in soil</i>	35
2.6.2 <i>Soil microbial communities</i>	36
2.6.3 <i>Relationship between composition of bacterial communities and processes in soil</i> ...	40
2.7 Discussion.....	41
2.8 Acknowledgements.....	44
Conclusion et perspectives.....	45
Bibliographie.....	47

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Number of samples, sequencing effort and alpha diversity in soil microcosms.....	40
--	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Exemple d'une courbe de raréfaction.....	16
Figure 2.1 : Incidence of soil treatments on microbial processes.....	39
Figure 2.2 : Incidence of soil treatments on bacterial community structure.....	42
Figure 2.3 : Covariation in microbial processes and taxonomic composition in soil microcosms.....	44

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES

EPS	Extracellular polymeric substances
CO	Monoxyde de carbone
H ₂	Dihydrogène
MEA	Millenium Ecosystem Assessment
CO ₂	Dioxyde de carbone
BEF	Biodiversity and ecosystem functioning
BOC	Bactéries oxydant le CO
BOH	Bactéries oxydant le H ₂

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Le sol est formé de matière organique et inorganique. La matière inorganique provient de la roche mère altérée par des processus physiques ou chimiques la transformant en sable, limon et argile, différenciés selon la taille des particules. La matière organique comprend la litière, formée des résidus de végétaux, de mycètes et d'animaux. Sa transformation par le processus d'humification produit l'humus. Ce processus est caractérisé par la modification de grandes molécules organiques en molécules plus petites et moins complexes, qui seront en partie utilisées pour la synthèse de molécules plus complexes par certains microorganismes ou continueront à être décomposées. Les substances humiques ainsi produites se classifient sous trois groupes chimiques soient : les acides fulviques, les acides humiques et les humines (Kutílek & Nielsen, 2015). L'assemblage entre la matière organique et inorganique formera des agrégats de différentes dimensions qui produiront des pores dont la taille se mesurera à une échelle variant d'une fraction de micromètre jusqu'au millimètre. Le sol intègre donc une phase solide, une phase aqueuse et une phase gazeuse où les concentrations d'éléments et de nutriments varient selon la taille des pores (Ranjard & Richaume, 2001), la présence de microorganismes et la proximité de l'eau et des substrats (Kutílek & Nielsen, 2015). Ceci fait du sol un environnement hétérogène composé de nombreux microhabitats caractérisés par des gradients en concentrations et variétés d'éléments pouvant varier dans une échelle spatiale aussi fine que le micromètre (Lehmann *et al.*, 2008; Vos *et al.*, 2013; Young & Crawford, 2004).

En 2005, le MEA (Millenium Ecosystem Assessment) a été publié afin d'évaluer l'impact des changements climatiques sur le bien-être des humains. Dans ce rapport, un service écosystémique est défini comme étant un bénéfice produit par les écosystèmes pour les humains. Le sol est l'hôte de nombreuses fonctions qui supportent la production de services écosystémiques (Blum, 2005). Il a été établi que le sol a sept fonctions majeures (Field *et al.*, 2016): (i) la production de biomasse incluant l'agriculture et la foresterie (ii) l'entreposage, la filtration et la transformation des nutriments, des substrats et de l'eau (iii) un réservoir de biodiversité incluant les habitats, les espèces et les gènes (iv) un environnement physique et culturel pour l'homme et ses activités (v) une source de matériaux bruts (vi) un réservoir de carbone organique (vii) et finalement, une archive géologique et un héritage archéologique. La quantité et la qualité des services écosystémiques produits par les sols dépendent de ses propriétés, et donc des sols différents assumeront différemment leurs services écosystémiques.

On peut classer les propriétés du sol sous quatre classes majeures (Adhikari & Hartemink, 2016) : (i) la quantité de carbone (ii) les propriétés physico-chimiques (iii) les propriétés hydrologiques (iv) et les propriétés biologiques. Finalement, une classification dynamique des sols existe pour rassembler les connaissances sur les propriétés et l'utilisabilité du type de sol et ainsi permettre d'avoir un cadre pour formuler des hypothèses sur sa genèse et l'entretien qu'il nécessite. Cette taxonomie se base sur une organisation hiérarchique où les hauts niveaux représentent les plus grandes différences de l'environnement du sol relié à sa genèse, devenant plus spécifique en descendant les échelons. Les propriétés utilisées pour discriminer les sols sont observables et mesurables sur le terrain ou dans un laboratoire (Group *et al.*, 1998).

Dans le cadre de ce mémoire, une attention particulière est portée sur les propriétés biologiques du sol, notamment sa biodiversité. Malgré le fait que la protection de la biodiversité des sols soit un objectif légitime pour assurer la provision de services écosystémiques à l'humanité, il est difficile d'établir des seuils critiques et compromis dans les politiques. Ceci représente d'ailleurs un grand défi pour le monde microbien pour lequel les notions de redondance fonctionnelle, la dormance et la haute fréquence des transferts et changements génétiques laissent présager une forte résistance ou résilience de leurs fonctions face à des perturbations environnementales.

1.1 LA BIODIVERSITÉ DU SOL

Les microorganismes représentent la plus grande source de biodiversité sur Terre, on estime le nombre d'espèces total entre 10^{11} et 10^{12} (Locey & Lennon, 2016). Le sol est le réservoir de la plus grande biodiversité, avec plus de 10 000 espèces de procaryotes (Curtis & Sloan, 2004; Rosselló-Mora & Amann, 2001) et une biomasse de 1 000 000 000 cellules bactériennes (Roesch *et al.*, 2007) dans un seul gramme de sol. Malgré cela, moins d'un pour cent du sol est occupé par les microbes (Young & Crawford, 2004) et la majorité des bactéries sont attachées aux surfaces à l'aide de matrice de substances extracellulaires polymériques (Or *et al.*, 2007).

L'hétérogénéité du sol est responsable de la génération du processus de radiation adaptative, qui se définit comme étant l'évolution de la diversité écologique et phénotypique dans la multiplication rapide d'une lignée. Elle explique la différenciation d'un ancêtre commun en une variété d'espèces habitant différents environnements et qui sous la pression de leur nouvel environnement se sont adaptées se caractérisant par des traits morphologiques et physiologiques distincts (Schluter, 2000). D'ailleurs, des études en laboratoire ont démontré qu'un environnement aux conditions variables favorisait ce processus, alors qu'une même souche de *Pseudomonas fluorescens* changeait de morphologie selon l'endroit où elle se trouvait dans un environnement hétérogène, pendant que cette même souche ne se différenciait pas lorsque dans un environnement homogène (Rainey & Travisano, 1998). Ce type de différenciation a également été observé chez *Escherichia coli* alors que les souches descendantes se différenciaient par rapport à leur efficacité pour dégrader différentes sources de carbone (Friesen *et al.*, 2004).

La structure des communautés microbiennes du sol est dynamique et les facteurs influençant la diversité microbienne sont nombreux et complexes. Par exemple, des études ont montré que cette diversité variait au niveau spatial selon différents facteurs physico-chimiques, notamment en fonction d'un gradient de pH (Griffiths *et al.*, 2011; Lauber *et al.*, 2009), d'un gradient d'azote (Fierer *et al.*, 2012), de la diversité du couvert végétal (Kowalchuk *et al.*, 2002; Rajaniemi & Allison, 2009) ou de la présence de différents minéraux (Carson *et al.*, 2009). Les facteurs biotiques combinés aux facteurs abiotiques influencent aussi la distribution des communautés microbiennes. Par exemple, un isolement spatiale favorisera la présence d'espèces peu compétitives, dans un environnement riche en éléments nutritifs. Cet isolement spatial est particulièrement favorisé lorsque le sol n'est pas saturé en eau (Dechesne *et al.*, 2008; Treves *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2002) ou en présence d'un sol caractérisé par une distribution de particules

de tailles différentes (Carson *et al.*, 2010). Finalement, les communautés subissent une succession temporelle telle que montrée par Lipson *et al.* (2009) alors que le profil des communautés microbiennes d'une forêt de conifères varie en fonction des saisons. (Lipson *et al.*, 2009)

1.1.1 La biodiversité

Le terme biodiversité peut prendre plusieurs définitions, ce qui peut entraîner une certaine confusion, il importe donc de le définir au préalable afin de bien comprendre la mise en contexte du sujet de ce mémoire. De nombreuses méthodes existent afin de quantifier et caractériser cette biodiversité, chacune présentant des avantages et des inconvénients selon les propriétés étudiées. En 1972, Whittaker propose une méthode pour classifier la biodiversité qui sera ensuite adoptée par la majorité des écologistes. Elle compartimente la biodiversité en trois éléments: la diversité alpha, la diversité bêta et la diversité gamma. La diversité alpha mesure la richesse spécifique, c'est-à-dire le nombre d'espèces présentes dans une aire connue et délimitée à l'intérieur d'une région à un moment précis. La diversité bêta informe sur la différence au niveau de la diversité des espèces entre deux échantillons comparant aussi bien différentes aires connues et délimités d'une même région (distribution spatiale) qu'une seule aire à deux moments différents (succession temporelle). La diversité gamma représente la diversité spécifique totale de la région et correspond à la somme de la diversité alpha et de la diversité bêta (Whittaker, 1972).

Comme il est improbable, voire impossible de représenter toutes les espèces présentes dans un écosystème lors d'un échantillonnage, des outils peuvent être utilisés pour estimer la richesse spécifique, dont l'estimateur de richesse Chao1. Cet outil utilise le nombre d'espèces rares détectées (à une ou deux reprises dans un échantillon) ainsi que le nombre total d'espèces observées afin d'en extrapoler la base de l'asymptote définissant la courbe de raréfaction d'un échantillonnage (**Figure 1**). Cette asymptote correspond au nombre total d'espèces estimé, S_{Chao1} (Chao, 1984) :

$$S_{\text{Chao1}} = S_{\text{obs}} + F_1^2/2F_2$$

où S_{obs} correspond au nombre d'espèces observées; F_1 représente le nombre d'espèces observées représentées par un seul individu (singletons) et F_2 le nombre d'espèces observées représentées par deux individus (doubleton).

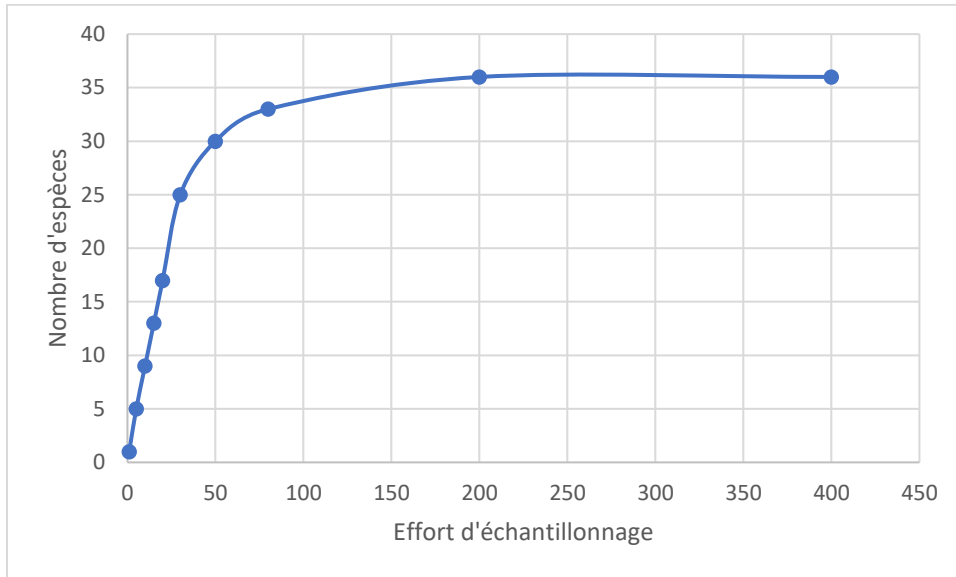


Figure 1. Exemple d'une courbe de raréfaction. La courbe de raréfaction représente la moyenne de la répétition d'échantillonnage (effort d'échantillonnage) d'un pool comprenant tous les individus ou échantillons. L'asymptote de la courbe représente une estimation du nombre total d'espèces présentes dans l'échantillon (Magurran, 2013).

Au-delà du nombre d'espèces, le concept d'équitabilité fournit des informations importantes sur un écosystème et se définit comme étant la répartition de l'abondance de chaque espèce à l'intérieur de ce système. Basés sur la richesse spécifique et l'équitabilité, il existe des indices de biodiversité et de dominance qui sont généralement calculés sur la base des ratios d'une partition du nombre des individus représentant une espèce sur le nombre total, tel que n_i/N où n_i est le nombre d'individus de l'espèce i alors que N est l'abondance totale d'individus de toutes les espèces. L'indice de diversité le plus souvent utilisé est le Shannon et l'indice de dominance le plus utilisé est le Simpson (Dash, 2001).

Indice de diversité de Shannon désigné selon H ou \hat{H} :

$$H = -\sum (n_i/N) \log_e (n_i/N)$$

Indice de dominance Simpson désigné selon D :

$$D = \sum (n_i/N)^2$$

Cependant, l'indice de Shannon présume que tous les individus sont échantillonnés aléatoirement dans une communauté infiniment grande et que toutes les espèces sont représentées dans l'échantillon. Comme il est très rare que la véritable richesse spécifique d'un assemblage soit connue (souvent dû à un échantillonnage où les espèces en faible abondance sont sous-représentées), un estimateur d'indice de Shannon non biaisé n'existe pas. Représentant la probabilité de reprise de la même espèce lors d'une collecte aléatoire d'espèces dans un échantillon, l'indice de Simpson est principalement affecté par les espèces ayant la plus grande abondance dans l'échantillon. Il est moins sensible à la richesse spécifique et est donc considéré comme une des mesures de diversité la plus robuste (Magurran, 2013).

1.1.2 Diversité bêta

La diversité bêta compare le nombre d'espèces et leur abondance relative ou leur présence/absence selon le type de variable utilisé, pour générer une mesure de distance ou de similarité de la biodiversité entre différents échantillons. Par exemple, l'indice de similarité de Jaccard permet de comparer deux échantillons, évaluant leur ressemblance en utilisant le rapport entre les espèces communes entre les deux échantillons et celles propres à chaque échantillon. L'indice varie entre 0 et 1 et lorsqu'il se rapproche de 1, le nombre d'espèces partagées entre les deux échantillons est plus grand et donc la biodiversité inter habitat est faible. Au contraire, l'indice qui tend vers 0 indique que le nombre d'espèces partagées entre les deux échantillons est petit donc la biodiversité inter habitat est forte.

$$J_{ij} = S_{ij}/S_i + S_j + S_{ij}$$

où J_{ij} est l'indice de similarité de Jaccard entre le site i et j , S_{ij} est les espèces communes aux deux sites, S_i et S_j sont les espèces uniques au site i et j respectivement. En microbiologie, la distribution de l'abondance des espèces bactériennes suit une binomiale négative où quelques espèces représentent une forte abondance relative alors que le reste est caractérisé par une infinité d'espèces présentes en faible abondance. De plus, l'utilisation du séquençage peut représenter une source de biais quant à la détection et la représentation justes de toutes les espèces présentes dans un échantillon et qui, dans le but de quantifier la biodiversité, offrent une forte incertitude sur la réalité de l'absence d'une espèce. Dans ce contexte, l'utilisation d'un indice

se basant seulement sur la présence et omettant l'abondance relative des espèces peut mener à des erreurs d'interprétation. Ceci explique la faible utilisation de l'indice de similarité de Jaccard en écologie microbienne au profit d'indices utilisant l'abondance des espèces tel que l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis.

L'indice de dissimilarité de Bray-Curtis est intéressant, car son calcul tient compte de l'abondance des espèces présentes dans les deux échantillons (Bray & Curtis, 1957) :

$$BC_{12} = (\sum_{j=1}^p y_{1j} - y_{2j}) / (\sum_{j=1}^p y_{1j} + y_{2j})$$

où BC_{12} est la distance de Bray-Curtis entre l'échantillon 1 et l'échantillon 2, j est l'espèce qui est comparée dans les deux échantillons, p est le nombre total d'espèces dans les deux échantillons, y_{1j} est l'abondance de l'espèce j dans l'échantillon 1 et y_{2j} est l'abondance de l'espèce j dans l'échantillon 2 (Legendre & Legendre, 1998).

1.1.3 Diversité fonctionnelle et l'importance de mesurer les fonctions

En microbiologie, la notion d'espèce est assez difficile à délimiter. En général elle se définit selon un seuil minimal d'identité (97%) entre la région hautement conservée du gène codant la sous-unité de l'ARNr 16S (Giovannoni *et al.*, 1990) ou en fonction d'un seuil minimal d'identité moyenne des nucléotides (ANI) du génome (Kim *et al.*, 2014). Cette difficulté a poussé les chercheurs à développer le concept de diversité fonctionnelle qui vise une compréhension des communautés et de l'écosystème basé sur ce que les organismes font plutôt que leur histoire évolutive. Elle se mesure à partir des traits fonctionnels, qui représentent les composantes du phénotype d'un organisme qui influencent le nombre et le niveau de processus d'un écosystème (Petchey & Gaston, 2006). Ceci permet une classification selon des groupes fonctionnels où chaque groupe comprend tous les organismes ayant le potentiel de contribuer à un processus particulier par le biais de traits physiologiques particuliers (Allison & Martiny, 2008). Les études tentant d'attribuer des fonctions selon l'identité taxonomique des espèces présentes dans des écosystèmes complexes tels que le sol et les eaux ne retrouvent aucune corrélation entre le changement d'environnement et le profil taxonomique des communautés alors qu'il y a une corrélation entre le changement d'environnement et le profil fonctionnel de l'écosystème (Louca *et al.*, 2017; Louca *et al.*, 2016; Nelson *et al.*, 2016). Ces résultats semblent indiquer que l'environnement sélectionnerait les groupes fonctionnels présents dans un écosystème alors que ce serait les

processus stochastiques qui détermineraient la composition taxonomique à l'intérieur de ces groupes. Ceci s'explique par le concept de la redondance fonctionnelle représentant l'habilité d'un taxon microbien d'effectuer un processus au même taux qu'un autre sous les mêmes conditions environnementales (Allison & Martiny, 2008). De plus, les termes fonctions généralistes et spécialistes sont souvent utilisés pour décrire le degré de redondance fonctionnel.

1.2 Le sol et les perturbations anthropogéniques

Afin de subvenir à ses besoins, l'humain recourt à des pratiques qui transforment les écosystèmes naturels, un processus communément appelé l'anthropisation. À titre d'exemple, il est estimé que 60% des services écosystémiques sont utilisés de façon non durable à l'échelle globale (Assessment, 2005). Au niveau du sol, la conversion des forêts se fait à grande échelle et on estime que plus de la moitié des forêts tropicales naturelles mondiales ont été converties en terres agricoles (Asner *et al.*, 2009). Ce changement d'utilisation des terres est d'autant plus important considérant la perte de biodiversité de la faune et de la flore des forêts tropicales. L'agriculture est la principale cause de cette déforestation mondiale en étant responsable pour environ 80% (Kissinger *et al.*, 2012). L'utilisation d'engrais continue d'augmenter, alors que ceci entraîne l'augmentation du taux de fixation et de dépôts d'azote en plus de l'ajout de phosphore dans les écosystèmes depuis l'époque préindustrielle (Galloway *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2015). Comme les propriétés microbiologiques du sol influencent le fonctionnement de l'écosystème, il importe de connaître l'impact des pratiques humaines sur les communautés microbiennes du sol. Différentes études scientifiques ont été effectuées afin de mettre la lumière sur le sujet. Certaines études ont comparé les communautés microbiennes de sol de forêt primaire selon un gradient d'utilisation des sols avoisinants étant anciennement des forêts primaires. Les conversions comprenaient (en ordre croissant de l'impact par l'humain) des forêts primaires ayant subies un stress, des forêts secondaires où l'agriculture a cessé depuis quelques ou plusieurs années et des sols où a lieu de l'agriculture mécanisée intensive depuis plusieurs années (Carvalho *et al.*, 2016; da C Jesus *et al.*, 2009). Dans ces études, la richesse spécifique n'était pas diminuée, elle était même parfois augmentée par l'activité agricole, mais la composition des communautés microbiennes divergeait en fonction de l'intensification de la conversion des terres. Les résultats sont soutenus lorsqu'il y a conversion de forêt en terre agricole autant dans les milieux tropicaux, tempérés que boréaux (Crowther *et al.*, 2014). Le changement de diversité bêta était encore le principal effet de la conversion des sols lorsque l'écosystème naturel transformé était une prairie

naturelle en plantation de peuplier, en rizière et en champ de montagne, à l'exception d'une perte significative de richesse spécifique pour la conversion en rizière (Cao *et al.*, 2017).

Certaines études mettent la lumière sur des mécanismes expliquant en partie cette perturbation des communautés microbiennes, telle que la conversion de forêts tropicales en culture pour l'huile de palme qui a pour résultat d'augmenter la richesse spécifique corrélée en raison d'une hausse du pH du sol (Lee-Cruz *et al.*, 2013; Wood *et al.*, 2017). L'ajout de phosphore et d'azote dans les sols n'affecte pas significativement la richesse spécifique des sols, cependant, elle perturbe la structure des communautés (Fierer *et al.*, 2012; Leff *et al.*, 2015) en favorisant les bactéries considérées comme copiotrophes (stratégie de croissance de type *r* bénéficiant d'une abondance d'éléments nutritifs) au détriment de celles considérées de type oligotrophes (stratégie de croissance de type *K* compétitive lorsque les éléments nutritifs sont limitants). En résumé, l'impact anthropique semble avoir un plus grand effet sur la modification de la diversité bêta que la diversité alpha. Les études de la biodiversité et du fonctionnement des écosystèmes sont nécessaires afin de déterminer l'impact d'une modification de la biodiversité sur les services écosystémiques offerts par les écosystèmes.

1.3 Étude de la biodiversité et du fonctionnement des écosystèmes (BEF)

La fin du vingtième siècle fût marquée par une augmentation du nombre d'études portant sur la biodiversité et son impact sur le fonctionnement des écosystèmes. Malgré quelques études dans les années 1990 (Atlas *et al.*, 1991; Degens, 1998), il faut attendre au début du 21^e siècle pour voir cette éclosion dans le monde de la microbiologie grâce à l'arrivée des nouvelles technologies de séquençage, notamment le séquençage à haut débit, permettant une plus grande rapidité d'exécution et l'obtention de profils de communautés microbiennes avec une résolution sans précédent. Les impacts d'un changement de biodiversité sur un écosystème peuvent se mesurer à court ou à long terme. À court terme, c'est le nombre et la productivité des fonctions d'un écosystème qui doivent être mesurés. À long terme, c'est la stabilité de l'écosystème qui sera observée. Celle-ci est composée de la résistance et de la résilience. La résistance est le degré d'amplitude d'une ou plusieurs perturbations auxquelles l'écosystème peut subir avant que l'on note une diminution d'une ou plusieurs fonctions. La résilience est le temps nécessaire ainsi que la capacité d'un écosystème à recommencer à produire les fonctions avec un niveau de productivité équivalent à celui observé avant la perturbation (Allison & Martiny, 2008).

Trois stratégies existent pour étudier l'impact d'une modification de la biodiversité sur le fonctionnement d'un écosystème. En premier lieu, il y a l'étude par l'observation d'une fonction dans un milieu naturel où il y a une gradation de la biodiversité. Ce gradient de biodiversité peut être causé par des perturbations environnementales (e.g. utilisation des terres, coupes à blanc, rejet de polluants) ou par des traitements expérimentaux (e.g. ajout différentes doses de substrats). Ce type d'étude est intéressant pour se faire une idée sur la sensibilité d'une fonction lorsqu'elle est corrélée à un changement de biodiversité. Par exemple, une étude menée par (Levine *et al.*, 2011) montre une corrélation entre la diminution de l'activité d'oxydation du méthane d'un sol et la perte de richesse spécifique au niveau des méthanotrophes qui suit un gradient d'utilisation de sol allant d'une forêt de feuillus à un champ d'agriculture. D'autres chercheurs comparant l'efficacité de bioremédiation de sédiments contaminés par des hydrocarbures ont noté une corrélation entre la richesse spécifique des communautés microbiennes et les performances de bioremédiation (Dell'Anno *et al.*, 2012). Le désavantage est qu'il est impossible de démontrer un effet de causalité puisque des facteurs externes non contrôlés, en plus du gradient de biodiversité, peuvent se manifester à l'insu de l'expérimentateur, l'empêchant ainsi d'isoler la variable biodiversité. Le deuxième type d'étude se fait par l'assemblage de communautés synthétiques (Bell *et al.*, 2005; Rivett & Bell, 2018; van Elsas *et al.*, 2012). L'avantage est qu'on peut approfondir nos connaissances sur le mécanisme qui explique le degré de fonctionnement d'un écosystème. À titre d'exemple, ces études permettent de vérifier si chaque espèce présente contribue également à une fonction en se répartissant équitablement la tâche ou si seulement quelques espèces sont importantes pour effectuer une fonction et qu'en augmentant le nombre d'espèces on augmente la probabilité de sélectionner ces espèces. Le désavantage est que plusieurs études utilisent des communautés artificielles ne rassemblant que tout au plus des dizaines d'espèces alors qu'un environnement comme le sol rassemble plutôt des dizaines de milliers d'espèces qui peuvent entrer en interaction. Ce problème peut être contourné par des expériences utilisant des jardins communs où le but est de transplanter complètement des communautés microbiennes présentant différents niveaux de biodiversité tout en standardisant tous les paramètres environnementaux (Reed & Martiny, 2007). Le dernier type d'étude utilise une approche par érosion de la biodiversité c'est-à-dire l'établissement d'un gradient de biodiversité par l'élimination d'espèces. En microbiologie, cette érosion peut se faire par l'ajout d'un agent chimique tel que la fumigation par chloroforme pour créer un gradient de biomasse survivante selon la durée de l'exposition (Degens, 1998; Griffiths *et al.*, 2000). Cette approche est moins utilisée puisqu'elle influence la nature du sol tout en effectuant une sélection artificielle favorisant les espèces tolérantes au produit chimique utilisé.

L'érosion se fait aussi par l'approche de dilution vers extinction où un sol est prélevé et une partie sera stérilisée et utilisée comme matrice pour l'autre partie utilisée comme inoculum dilué dans l'eau à différents gradients permettant alors de comparer comment les différentes fonctions sont impactées par ce gradient. Ce dernier type d'étude est le plus utilisé dans la littérature scientifique en microbiologie (Baumann *et al.*, 2013; Ho *et al.*, 2011; Maron *et al.*, 2018; Philippot *et al.*, 2013; Wertz *et al.*, 2006; Wertz *et al.*, 2007; Wittebolle *et al.*, 2009). Par contre, ce type de dilution peut apporter un biais puisqu'il a été montré que cette approche ne permettait pas la séparation entre toutes les bactéries et les particules de sol, favorisant ainsi certains groupes par rapport à d'autres (Yan *et al.*, 2015). De façon plus importante, cette approche cause l'extinction des espèces rares rendant difficile la différenciation du mécanisme responsable entre l'importance relative de la présence/absence des espèces impliquées dans une fonction de manière directe ou indirecte (par des mécanismes d'interactions microbe-microbe) ou simplement la perte de richesse spécifique.

1.3.1 Mécanismes expliquant BEF

Baas-Becking, célèbre pour sa citation : « tout est partout, l'environnement sélectionne (Baas-Becking, 1934) » reflète un courant de pensée fort qui, jusqu'à l'arrivée des techniques moléculaires pour l'écologie microbienne au milieu des années 1980 (Pace *et al.*, 1986) et plus récemment des technologies de séquençage à haut débit, laissait croire que la diversité microbienne était inépuisable. Ce développement technologique a permis une avancée de la biogéographie microbienne dont le patron de distribution des microbes n'obéit pas à l'hypothèse avancée par Baas-Becking (Papke *et al.*, 2003; Whitaker *et al.*, 2003). Des études de « jardin commun » où des communautés microbiennes provenant de différents environnements sont utilisées pour recoloniser un même environnement réfutent aussi cette hypothèse puisque les communautés ne convergent pas suite à la recolonisation (Langenheder *et al.*, 2005; Langenheder *et al.*, 2006). De nos jours, c'est plutôt l'hypothèse d'assurance développée par Yachi et Loreau qui est acceptée. Celle-ci stipule que dans un environnement soumis à des fluctuations, une grande richesse spécifique assurera la présence d'espèces pouvant effectuer les fonctions de l'écosystème lorsqu'une perturbation éliminera ou diminuera la présence d'espèces en charge des fonctions dans les conditions initiales (Yachi & Loreau, 1999). De plus, lors de l'élaboration de leur modèle, ils ont montré que la présence d'une grande richesse

spécifique permet de tamponner l'effet d'une perturbation sur la productivité des fonctions en plus de les augmenter.

Deux principaux mécanismes peuvent expliquer l'effet qu'a la biodiversité sur le fonctionnement des écosystèmes; le mécanisme de complémentarité et le mécanisme de sélection. Le mécanisme de complémentarité tire avantage de la variation des traits écologiques des différentes espèces qui forme la base pour l'association permanente d'espèce qui augmente la performance collective (Loreau, 2000). Par exemple, une étude montre qu'une augmentation de la richesse spécifique des hétérotrophes augmente le processus d'oxydation du méthane par la guildes de méthanotrophe par la sécrétion de composés organiques volatils (Ho *et al.*, 2014; Veraart *et al.*, 2018). Le mécanisme de sélection s'explique par la variation de trait qui est la condition initiale suivie par un processus de sélection favorisant une dominance de l'espèce possédant la valeur de trait extrême (Loreau, 2000). En résumé, dans le cadre du mécanisme de complémentarité, l'augmentation de la richesse spécifique permet une exploitation optimale de l'environnement par les processus d'interactions directes et indirectes entre les différentes espèces se traduisant par une augmentation du nombre ou de la productivité d'une fonction jusqu'à l'atteinte du seuil critique où l'ajout d'espèces augmentera la redondance fonctionnelle. Dans le cas du mécanisme de sélection, l'ajout d'une espèce ne se traduit pas nécessairement par l'augmentation d'une fonction si l'espèce possède des traits favorisant la compétition dans un environnement donné mais ne produit pas la fonction étudiée. Les BEF montrent que les deux processus sont responsables du changement de fonctionnement d'un écosystème et que les fonctions appartenant à des groupes fonctionnels où la redondance est grande (généralistes) telles que la respiration du CO₂ (Langenheder *et al.*, 2006; Levine *et al.*, 2011; Wertz *et al.*, 2006) et l'utilisation de source de carbone labile (Baumann *et al.*, 2013; Girvan *et al.*, 2005), ne semblent pas sensibles à une perte de la biodiversité alors que les fonctions appartenant à des groupes fonctionnels où la redondance est moins grande (spécialistes) telles que l'utilisation de sources de carbone récalcitrantes (Baumann *et al.*, 2013; Girvan *et al.*, 2005; Maron *et al.*, 2018), la dénitrification (Philippot *et al.*, 2013), l'oxydation du méthane (Ho *et al.*, 2014; Levine *et al.*, 2011) et la dégradation d'hydrocarbures dans un processus de bioremédiation (Dell'Anno *et al.*, 2012) ont une perte significative de leur fonctionnement lors d'une diminution de la diversité alpha (richesse spécifique). Afin de mieux comprendre la diminution des fonctions de types spécialistes, il importe d'approfondir nos connaissances sur la communauté rare.

1.3.2 Disproportion entre abondance et fonctionnalité

La distribution des communautés bactériennes suit une fonction binomiale négative représentée par peu d'espèces ayant une forte abondance faisant en sorte que la majeure partie de la biomasse est représentée par des espèces présentes en faible abondance relevant une diversité génétique élevée qui représente la biosphère rare (Pedrós-Alió, 2006; Sogin *et al.*, 2006). Il n'y a pas de consensus clair dans la littérature quant au seuil de l'abondance distinguant une espèce appartenant à cette biosphère, mais elle est généralement décrite comme les espèces composant moins de 0,1% de la biomasse. La biosphère rare, de par sa faible abondance, serait plus sensible à un changement de l'environnement (Gaston, 2008; Reid & Buckley, 2011). De plus, les espèces qui la composent tendent à avoir un profil génétique qui diverge des espèces dominantes au niveau évolutionnaire en ayant subi différentes pressions écologiques qui pourraient leur donner un rôle écologique important (Elshahed *et al.*, 2008; Galand *et al.*, 2009; Lynch *et al.*, 2012; Youssef *et al.*, 2012).

Il n'existe pas de relation directe entre l'abondance des espèces et l'intensité de la fonction prise en charge par la collectivité. Cette relation semble varier en fonction du type de fonction ainsi que des conditions environnementales. Par exemple, *Leptospirillum ferrodiazotrophum* qui vaut pour moins de 10% de la biomasse d'une communauté microbienne vivant dans les drainages acides de mines effectue à lui seul la fonction de fixation d'azote (Tyson *et al.*, 2005). De même, les cyanobactéries coccoïdes composant 1% des séquences des communautés bactériennes sont responsables d'une grande fraction de la fixation d'azote dans plusieurs zones de l'océan pacifique (Montoya *et al.*, 2004). Finalement, les espèces du genre *Desulfosporosinus* représentant 0,006% des communautés bactériennes sont des contributeurs majeurs dans la réduction des sulfates dans les tourbières (Pester *et al.*, 2010). En résumé, certaines fonctions sont supportées en majorité par des espèces abondantes telles que *Leptospirillum ferrodiazotrophum* présentant près de 10% d'abondance alors que d'autres fonctions sont supportées par des espèces à faible et très faible abondance (1 et 0,006%). Ceci montre l'importance de protéger la communauté rare puisque celle-ci peut être responsable d'une grande partie de production de certaines fonctions.

1.4 Contexte de l'étude

Notre laboratoire se spécialise sur deux groupes fonctionnels non dominants dans les communautés microbiennes, soient les bactéries oxydants le dihydrogène (H₂) à haute affinité

qui comprennent 7 embranchements (Greening *et al.*, 2016), et les bactéries oxydant le monoxyde de carbone (CO) à haute affinité qui comprennent 3 embranchements (King & Weber, 2007). Lors d'études antérieures, des collègues ont déterminé que l'abondance relative de ces deux groupes dans le sol représentait moins de 1% pour les HOB (Khdhiri *et al.*, 2015b) et environ 3% pour les COB (Lalonde & Constant, 2016b). Des études subséquentes, visant à observer l'effet de l'exposition du sol à une forte concentration d'H₂ sur les communautés microbiennes ont montré que l'altération de la vitesse d'oxydation du H₂ induite par ce traitement d'exposition du sol était dépendante de la biodiversité alors que le processus d'utilisation de sources de carbone organique ne l'était pas (Khdhiri *et al.*, 2017).

L'objectif général de cette étude est de démontrer le lien de causalité qui existe entre la diversité microbienne et l'activité d'oxydation de l'H₂ et du CO dans le sol. Contrairement à ces fonctions spécialistes, la respiration du CO₂ et le profil d'utilisation de diverses sources de carbone organiques ne devraient pas démontrer la même sensibilité à une variation de la biodiversité microbienne dans le sol. Pour tester ces hypothèses, une expérience d'érosion de la biodiversité microbienne d'un sol forestier a été mise en place. Le changement de biodiversité ciblé consistait à simuler une certaine réalité de l'impact anthropogénique sur les sols, c'est-à-dire une perturbation de la diversité bêta sans nécessairement entraîner une perte de richesse spécifique. En plus d'appliquer une série de dilutions entre une fraction de sol stérile et une seconde non stérile, deux antibiotiques (carbenicilline et tétracycline) furent ajoutés ou non aux mélanges de sols dans le but de perturber les successions microbiennes dans les sols. L'effet des différents traitements sur la structure des communautés microbiennes a été déterminé par séquençage d'amplicons de PCR du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S des bactéries. Une série d'essais de chromatographie en phase gazeuse et d'épreuves biologiques ont permis de déterminer la réponse des activités microbiennes aux différents traitements.

CHAPITRE 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE

Titre: Biological H₂ and CO oxidation activities are sensitive to compositional change of soil microbial communities

Auteurs: Saavedra-Lavoie Julien, De La Porte Anne, Piché-Choquette Sarah, Guertin Claude, Constant Philippe

État actuel: Soumis au journal Applied and Environmental Microbiology, numéro de soumission : AEM01223-19.

2.1 Contribution à l'article

Anne De La Porte a participé à l'élaboration du projet et les tests préliminaires en laboratoires, Sarah Piché-Choquette a participé au traitement des séquences provenant de illumina Miseq, Claude Guertin a participé à la rédaction de l'article et au soutien matériel, Philippe Constant a participé à l'élaboration du projet, l'analyse des résultats, l'écriture de l'article en plus du soutien matériel et technique. Julien Saavedra-Lavoie a participé à l'élaboration du projet, toutes les manipulations en laboratoire, l'analyse des résultats et à l'écriture de l'article.

2.2 Résumé

Les microbes représentent des puits importants pour de nombreux gaz traces et leur activité influence directement la capacité oxydative de la troposphère. Cependant, les connaissances sont pauvres concernant leur réponse face à une modification de la biodiversité. Cette expérience visait à évaluer la susceptibilité de quatre fonctions à une altération de la biodiversité microbienne du sol. Ces fonctions comprenaient deux fonctions généralistes, soient le profil d'utilisation de diverses sources de carbone organique (CLPP) et la respiration du dioxyde de carbone (CO₂), et deux fonctions spécialistes, soient l'oxydation du dihydrogène (H₂) et l'oxydation du monoxyde de carbone (CO). Une manipulation de la biodiversité fut réalisée par trois différents rapports d'un mélange de sol forestier non stérile : stérile (1:4, 1:20 et 1:40), en présence ou non de deux antibiotiques. Les microcosmes de sol ont été incubés sous atmosphère contrôlée, assurant la disponibilité de l'H₂ et du CO durant leur colonisation par les microorganismes. Le séquençage d'amplicons de PCR du gène codant pour l'ARNr 16S des bactéries a montré que la composition, et non la richesse spécifique des communautés microbiennes avait été influencée par les traitements. Malgré l'absence d'extinction d'espèce, des baisses atteignant entre 58-98% et 55-

99% pour l'oxydation du H₂ et du CO, respectivement, ont été mesuré en comparaison au sol non dilué. Les fonctions généralistes n'ont pas été atténuées montrant une augmentation de 15% du CLPP dans les traitements 1 : 20 et 1 : 40 avec antibiotiques. Ces résultats montrent la complexité du fonctionnement des écosystèmes tout en proposant l'analyse de la susceptibilité des guildes microbiennes fonctionnelles à une altération de la biodiversité pour élaborer nouveaux outils de protection de l'environnement.

2.3 Abstract

Despite the importance of the microbial uptake of trace gases in controlling the oxidative capacity of the troposphere, little is known about their response to changes in belowground biodiversity. This article bridges that knowledge gap by examining the response of microbial community level physiological profiles (CLPP), carbon dioxide (CO₂) respiration, and molecular hydrogen (H₂) and carbon monoxide (CO) oxidation activities to manipulation of microbial diversity in soil microcosms. Biodiversity manipulation consisted of a dilution treatment comprising three different ratios of non-sterile:sterile soil mixtures, with or without the addition of antibiotics. Non-sterile soil without antibiotic was used as a reference. PCR amplicon sequencing of the bacterial 16S rRNA gene revealed significant changes in species composition in microcosms and no significant difference in species richness. Soil dilution exerted no significant impact on CO₂ respiration. Otherwise, CLPP was 15% higher in dilution and antibiotic treatments than reference microcosms, without difference between treatments groups. Soil dilution caused 58-98% and 54-99% losses of H₂ and CO oxidation activities, respectively, relative to reference microcosms, without significant response to antibiotics. Abatement of H₂ and CO oxidation activities in microcosms was explained by dissimilarity of their bacterial community profile from reference microcosms, implying sensitivity of atmospheric H₂ and CO oxidation processes to compositional changes in soil microbial communities.

2.4 Introduction

Soil is a heterogeneous environment where aboveground biomass, void surrounding aggregates, and uneven water availability are shaping various nutrient, physical, and chemical gradients (Lehmann *et al.*, 2008; Vos *et al.*, 2013; Young & Crawford, 2004). The mosaic landscape of soil

exerts environmental filtering on microbial communities demonstrating remarkable metabolic flexibility and adaptation capabilities as evidenced by the 10,000 species contained in one gram soil (Curtis & Sloan, 2004; Rosselló-Mora & Amann, 2001). These communities are represented by hundreds to thousands of genotypes with a disproportional contribution of rare species in biogeochemical processes. In line with the insurance hypothesis proposed by Yachi and Loreau (Yachi & Loreau, 1999), rare species are expected to play the role of a seed bank, securing ecosystem processes resistance and resilience to environmental cues. Several field- and laboratory-scale investigations support the biodiversity-ecosystem functioning relationship (Hooper *et al.*, 2005). Although mostly examined in animal and plant systems, this link holds for the microbial world, as shown recently by a significant correlation between soil microbial diversity and functions related to nutrient cycling and biological productivity (Delgado-Baquerizo *et al.*, 2016). Response patterns of microbial biodiversity to global change is complicated, but alterations in precipitations, temperature, and CO₂ level may trigger alterations in microbial communities composition (Blankinship *et al.*, 2011). Examination of the sensitivity of individual microbial processes to loss of biodiversity is needed to document their interdependence, and support the economic valuation of biodiversity (Seddon *et al.*, 2016).

Most of the microbial biodiversity-ecosystem functioning studies rely on comparative experimental approaches where biodiversity is a dependent variable, impairing causal inference (Krause *et al.*, 2014). Direct manipulation of diversity is essential to determine the contribution of biodiversity in the productivity of a function. This can be accomplished by assembling a combination of synthetic microbial populations or by a reduction of diversity by progressive fumigation or dilution to extinction approach. Studies using direct manipulation of diversity show that species richness and relative abundance drive ecosystem functioning (Bell *et al.*, 2005; Dell'Anno *et al.*, 2012). The impact on productivity of the function is different depending on whether specialized functions such as recalcitrant carbon degradation (Maron *et al.*, 2018) and denitrification (Philippot *et al.*, 2013), or a broad function such as CO₂ respiration (Langenheder *et al.*, 2006) and labile carbon degradation (Baumann *et al.*, 2013) are examined.

The sensitivity of microbial uptake of trace gases to alterations in soil microbial diversity is underrepresented in literature, despite their mitigation of natural and anthropogenic emissions of climate-relevant trace gas in the atmosphere (Conrad, 1996). For instance, the soil uptake of atmospheric H₂ and CO involving specialized high-affinity H₂- and CO-oxidizing bacteria is

responsible for 80 and 15% of the global losses of H₂ and CO, respectively (Novelli *et al.*, 1999; Novelli *et al.*, 1998). These microbial processes are of critical importance, reducing the atmospheric lifetime of H₂ and CO for which the global burden modulates the oxidative capacity of the atmosphere (Monks, 2005). The phyla Actinobacteria, Proteobacteria, Chloroflexi, and Acidobacteria represent high-affinity H₂-oxidizing (Constant *et al.*, 2010; Greening *et al.*, 2014; Greening *et al.*, 2015; Islam *et al.*, 2019), while high-affinity CO-oxidizing bacteria encompass the phyla Proteobacteria, Actinobacteria, and Chloroflexi (King & Weber, 2007). Environmental H₂- and CO-oxidizing bacteria are poorly represented in public genome databases, but the estimation of their relative abundance using qPCR approaches suggests they could represent between 1 and 3% soil bacterial communities (Khdhiri *et al.*, 2015a; Lalonde & Constant, 2016a), respectively.

This study explores the sensitivity of H₂ and CO soil uptake activities to manipulation of soil microbial diversity. Responses of the generalist functions CO₂ respiration and community level physiological profiles (CLPP) involving a broad diversity of saprophyte fungi and heterotrophic bacteria were also monitored for comparison. Soil biodiversity was manipulated using modest dilutions and the addition of antibiotics. These treatments were expected to exert more incidence on composition than species richness of soil microbial communities. Alterations in the composition of soil bacterial communities were assessed through 16S rRNA gene PCR-amplicon sequencing after 21, 28, 35, and 42 days incubation.

2.5 Material and methods

2.5.1 Soil samples

Soil samples were collected in a sugar maple forest (45.55 N; 73.73 W) on April, July and September 2017. The upper layer (10 cm) of the B horizon was collected after the removal of the litter, fermented, and humus soil horizons (upper 2- to 5-cm layer). Soils were homogenized (2 mm sieve) with a vibratory sieve shaker (AS 200; Retsch GmbH, Haan, Germany). They were then partitioned in two subsamples: a first part designated as “soil inoculum” was stored at 4°C and a second portion designated as “sterile soil substrate” was stored at -20°C after sterilization

by Cobalt 60 irradiation at 50 kGy dose (Nordion, Laval, Canada), eliminating most soil bacteria (McNamara *et al.*, 2003). Incubation was done within a week after sieving.

2.5.2 Preparation and incubation of soil microcosms

Soil microcosms (160 g) were prepared by mixing soil inoculum and sterile soil substrate at three different ratios (1:4, 1:20, and 1:40). A fixed amount of conditioned 0.5 mm diameter glass beads (40 g) was added to each microcosm. Beads conditioning consisted in the addition of 13 ml methanol with or without carbenicillin (11 mg ml⁻¹) and tetracycline (12 mg ml⁻¹) antibiotics mixture to beads aliquots that were subsequently thoroughly mixed and dried for a 12-h period in a chemical fume hood. Conditioned glass beads were used as the vector for carbenicillin (118 mg kg⁻¹) and tetracycline (125 mg kg⁻¹) in soil (Thiele-Bruhn & Beck, 2005). Preliminary experiments demonstrated that the antibiotics dose exerted no significant incidence on H₂ and CO oxidation activities in soil, while soil respiration increased by a factor of two (data not shown). Soil microcosms comprising 160 g soil inoculum and 40 g conditioned glass beads with methanol were included as the reference in the experiment. A total of seven microcosms (3 soil dilutions X 2 antibiotic treatments and 1 reference) were set up. The whole experiment was repeated three times, with three different incubations (blocks) involving independent soil samples collected in April, July, and September 2017 for a total of twenty-one soil microcosms (seven microcosms X 3 blocks).

Soil microcosms were incubated in cell culture flasks (Falcon™ 225 cm³) exposed to a dynamic headspace where the air composition reflected the atmospheric concentration of trace gases (Khdhiri *et al.*, 2017). The incubation comprised two stages, namely the pre-incubation stage (day 1 to 20) aimed at establishing equivalent bacterial biomass between each microcosm and the sampling stage (day 21, 28, 35 and 42) dedicated to microbial activity measurements and DNA extraction. Soil samples dedicated to DNA extraction (0.5 g) were transferred to 2-ml microtube containing 0.5 g glass beads (0.15-0.21 mm diameter), 1 ml TEP buffer (Krsek & Wellington, 1999) and 20 µl sodium dodecyl sulfate 20%. Soil water content was adjusted to 25% water holding capacity and regularly monitored during microcosms incubation by a standard gravimetric method. Sterile water was added to maintain constant the soil moisture level in microcosms.

2.5.3 Measurement of microbial processes

High-affinity H₂ and CO oxidation rates were measured using a gas chromatograph equipped with a reduction gas detector (Khdhiri *et al.*, 2015a). Briefly, soil subsamples (10 g) were collected from microcosms and transferred in 500 ml sterile Wheaton glass bottles. Screw caps fitted with a septum enabled successive injections of defined volumes (3 ml) of a certified gas mixture containing 520 ± 10 part per million by volume (ppmv) H₂ and a second certified gas mixture containing 510 ± 10 ppmv CO (Distribution Praxair Canada, Saint-Laurent, Canada) in the static headspace. First-order oxidation rates were computed by integrating H₂ and CO time series recorded during 6 h. As the initial level of H₂ and CO was approximately 3 ppmv, high-affinity H₂- and CO-oxidizing bacteria were targeted in the assays. The net CO₂ production rate was measured using a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (Khdhiri *et al.*, 2017). Briefly, glass bottles containing 10 g subsamples were closed with screw caps fitted with a septum. Gas samples were collected from the static headspace to compute linear increase of CO₂ concentrations during 72 h. Finally, CLPP were obtained using EcoPlates assay (Biolog, Hayward, U.S.A.). The procedure was the same as described in a previous investigation (Khdhiri *et al.*, 2017), except that the incubation time was 7 d. instead of 4 d. Patterns of CLPP were expressed using the Shannon diversity index. For each of the three incubations, microbial processes were measured in the seven microcosms at days 21, 28, 35, and 42. H₂ and CO oxidation rate, CO₂ net respiration, and, CLPP presented in this article are proportional activities unless otherwise stated. Proportional activity was computed at each sampling date by dividing process rate or Shannon diversity index measured in microcosms subjected to biodiversity manipulation treatments by the value observed in control microcosm. A ratio above 1 indicated enhanced microbial process in response to treatment when compared to control microcosm. Raw data of process rate measurements are provided in table S1.

2.5.4 DNA extraction

Frozen soil subsamples dedicated to DNA extraction were thawed at room temperature before the application of mechanical lysis at 6.5 m s⁻¹ for 45 s with the FastPrep®-24 Sample Preparation System (MP Biomedicals, Santa Ana, U.S.A.). This procedure was repeated twice separated by a rest of the sample on ice for 5 min. DNA was purified through successive phenol/chloroform pH 7.0 and chloroform extractions separated by centrifugations at 21,130 x g at 4°C for 10 min. Purification was terminated by precipitation with 10 M AcNH₄ (addition one third of supernatant volume) followed by centrifugations (21,130 x g for 10 min) and separation of the supernatant in 2 microtubes to which two volumes of 95 % ethanol were added before nucleic acids precipitation at -20°C for at least 12 h. Microtubes were then centrifugated at 21,130 x g at 4°C for 15 min, and

the supernatant was disposed. The pellet was dried at room temperature under aseptic conditions and suspended in 100 µl nuclease-free sterile water. The extracted DNA was purified following the protocol of “One Step™ PCR inhibitor Removal Kits” (Zymo Research, Irvine, U.S.A.). The integrity of DNA was visualized on 1% agarose gel electrophoresis.

2.5.5 qPCR of bacterial 16S rRNA gene

The abundance of bacterial 16S rRNA gene copies in soil was determined by qPCR with the primers Eub-338 and Eub-518 (Fierer *et al.*, 2005). PCR-amplified 16S rRNA gene from *Escherichia coli* was used to generate standard curve with the primers forward primer PA-27f-YM (Frank *et al.*, 2008) and reverse primer PH (Fernández *et al.*, 1999) using Fast-Taq DNA polymerase kit (Bio Basic, Markham, Canada) on C1000 Touch Thermal Cycle (BioRad, Hercules, U.S.A.) thermocycler. Thermocycler program started with an initial denaturation at 95°C for 5 min followed by 30 cycles including denaturation at 95°C for 20 s, annealing at 50 °C for 40 s and elongation at 72 °C for 90 s, before a final elongation at 72 °C for 5 min. The standard was quantified using the QuantiFluor® ds DNA System protocol (Promega, Madison, U.S.A.) on a Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Mortlake, Australia). Serial dilutions of the PCR product were done to obtain a standard curve ranging from 1×10^9 to 1×10^1 copies of the strand matrix ($R^2 = 0.99$ and reaction efficiency between 0.9 and 1.1). Template DNA was diluted in nuclease-free water (1:100) prior to qPCR performed using the PerfeCTa® SYBR® Green FastMix® kit (Quanta Bio, Beverly, U.S.A.). Thermocycler program comprised an initial denaturation step at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles including successive denaturation step at 95°C for 45 s, annealing step at 55°C for 45 s, and elongation step at 72°C for 45 s. Fluorescence data was read during elongation phases. A melting curve completed the reaction from 72 to 99°C with a hold of 5 s.

2.5.6 PCR amplicon sequencing of bacterial 16S rRNA gene

Composition of soil bacterial communities was examined using genomic DNA extracted from the twenty one microcosms at days 21, 28, 35, and 42 (total of 84 DNA extracts). PCR amplifications necessary for the preparation of sequencing libraries were conducted with high fidelity AccuPrime™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.). The V6-V8 region of bacterial 16S rRNA gene was first PCR amplified using modified B969F and BA1406R primers (Comeau *et al.*, 2010) with the 5' linker sequence 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3' and 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3' for forward and reverse primers, respectively. C1000 Touch Thermal Cycle (BioRad, Hercules, U.S.A.) thermocycler

program started with an initial denaturation at 95°C for 5 min followed by 30 cycles comprising a first denaturation step at 94°C for 30 s, a second annealing step at 55°C for 30 s and a final elongation step at 68°C for 30 s, before a final elongation at 68°C for 10 min. PCR products were verified on agarose gel migration followed by a PCR clean-up using AMPure XP beads (Beckman Coulter, Brea, U.S.A.) to remove free primers and primer dimer species using manufacturer guidelines. Briefly, a ratio of 0.8 beads to PCR volume was added to PCR product and mixed by up and down. Mixture was incubated 5 min at room temperature before being placed on a magnetique stand (Alpaqua Engineering, Beverly, U.S.A.) for 2 min. Supernatant was discarded and two washes with 80% ethanol solution freshly prepared were performed. Excess ethanol was removed and PCR product was air dried for 10 min before being removed from the magnetic stand. Beads were resuspended in 52.5 ml of 10 mM Tris-HCl (pH 8.5) and incubated at room temperature for 2 min then placed on magnetic stand for 2 min. Supernatant was transferred in a 96-well plate for second PCR performed for the library preparation using Nextera XT kit (Illumina, San Diego, U.S.A.). Thermocycler program was identical to the first PCR but comprised 8 cycles. PCR products were verified on agarose gel migration followed by a PCR clean-up using AMPure XP beads (Beckman Coulter, Brea, U.S.A.). PCR amplicons were then quantified using Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.), diluted to 1.5 ng μl^{-1} and pooled together before shipping for sequencing. PCR amplicons were sequenced on Illumina MiSeq PE-250 platform at the McGill University and Genome Quebec Innovation Center. Raw sequencing reads were proceeded using the software Usearch version 10 (Edgar, 2010). Paired reads were assembled to a total length varying between 400 and 500 nucleotides then merged sequences were subject to quality control. Maximum mismatch threshold in the overlapped region of the assembly was set at 5, and primers were removed from each sequence. Sequences having 1 and less error base were accepted for downstream quality control steps. Reads were then dereplicated, singletons were discarded and denoised using Unoise 3 (Edgar, 2016). Sequences shorter than 366 nucleotides were discarded. Filtered sequences were clustered into amplicon sequence variants (ASV) displaying 100% identity (Callahan *et al.*, 2017). ASV representing less than 0.005% of read counts were removed. Taxonomic affiliation of ASV was predicted by the k-mer similarity of ASV representative sequences to the RDP (Ribosomal Database Project) version 16 training set of 16S rRNA gene for bacteria (Cole *et al.*, 2013). Due to uneven distribution of library size varying between 2 and 253,967 reads, solely the 36 libraries comprising between 10,000 and 50,000 reads were kept for downstream analyses (Table S1). Raw sequence reads were deposited in the Sequence Read Archive of the National Center for Biotechnology Information under the Bioproject PRJNA543329.

2.5.7 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the software R version 3.5.1 (Team, 2013). Microbial processes measured in microcosms subjected to soil dilution and antibiotics treatments were standardized with observed activity in control microcosms. Under this framework, proportional activity above 1.0 indicated an enhancement of microbial process in response to treatments when compared to control microcosms containing non-sterile soil without antibiotic. The hypothesis that the distribution of proportional activities among each treatment is different from 1.0 was determined by Wilcoxon tests with the package 'Stats' version 3.5.1. Alpha diversity based on the first three Hill numbers: $q = 0$ (species richness), $q = 1$ (the exponential of Shannon's entropy index), and $q = 2$ (the inverse of Simpson's concentration index) were computed with the package 'iNEXT' version 2.0.18 (Hsieh *et al.*, 2016). The three Hill numbers were interpolated at 5541 reads, corresponding to half of the number of reads obtained in the smallest sequencing library (Chao *et al.*, 2014). The impact of dilution and antibiotic treatments on the three alpha diversity indicators and the abundance of 16S rRNA gene copy $g_{(\text{soil-dw})}^{-1}$ were compared with Kruskal-Wallis test followed by a Dunn *post hoc* test using the package 'dunn.test' version 1.3.5 (Dinno, 2017). The incidence of treatment on beta diversity of bacterial communities was tested using two complementary strategies. Firstly, raw counts of ASV assigned to taxa identified as copiotrophic (*i.e.*, Bacteroides and Beta-Proteobacteria) and oligotrophic (*i.e.*, Acidobacteria) strategists (Fierer *et al.*, 2007) were clustered to explore whether sterile soil colonisation and specific treatments favored enrichment of copiotrophic bacteria less disposed to trace gas scavenging. The relative abundance of these three ecologically-relevant groups was compared between treatments using Kruskal-Wallis test followed by a Dunn *post hoc* test with the package 'dunn.test' version 1.3.5 (Dinno, 2017). Secondly, Hellinger transformation was applied on the sparse ASV table (Legendre & Gallagher, 2001) before the ordination of bacterial community profiles in a reduced space constrained by a principal coordinate analysis (PCoA). The PCoA was generated using the packages 'Phyloseq' version 1.24.2 (McMurdie & Holmes, 2013), 'ggplot2' version 3.0.0 (Wickham, 2016) and 'plyr' version 1.8.4 (Wickham, 2011). The impact of soil dilutions, antibiotics, and block on beta diversity were tested with the comparison of Bray-Curtis distance using a permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) with the package 'Vegan' version 2.5-2 (Oksanen *et al.*, 2013). Results of the PERMANOVA were presented in a Venn diagram done using the package 'VennDiagram' version 1.6.0 (Chen & Boutros, 2011). Linear regression analyses explaining the variation of proportional activities with the average Bray-Curtis

dissimilarity of bacterial community profiles separating each microcosm from the control were performed using package 'Stats' version 3.5.1.

2.6 Results

2.6.1 Microbial processes in soil

CO₂ respiration measured in control microcosms were in the range of $20 \pm 6.2 \text{ nmol g}_{(\text{soil-dw})}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Respiration rates were not distinguishable between control and the three dilution treatments (Wilcoxon, $p > 0.05$), albeit antibiotics led to a significant enhancement of the activity in 1:20 and 1:40 dilutions (Figure 1A). CLPP expressed as Shannon index was 2.88 ± 0.19 in the control microcosms. Intensification of the activity was observed in all dilution and antibiotic treatments (Wilcoxon, $p < 0.05$), without a difference between treatments groups (Figure 1B). CO and H₂ oxidation rates measured in control microcosms were in the range of 24 ± 15 and $26 \pm 13 \text{ nmol g}_{(\text{soil-dw})}^{-1} \text{ h}^{-1}$. The relative H₂ and CO oxidation activities of each dilution and antibiotic treatments were significantly lower than the 100% activity displayed by control microcosms (Wilcoxon, $p < 0.05$). The CO oxidation activity observed in the 1:4 dilution without antibiotics was not distinguishable from the 1:20 dilution without antibiotics (Figure 1C). H₂ oxidation activity measured in 1:20 and 1:40 dilution treatments were significantly lower than the 1:4 dilution (Figure 1D). These results show that soil dilution and antibiotic treatments affected differently generalist processes involved in CO₂ respiration and CLPP from specialist functions responsible for trace gas oxidation in soil. Subsequent examination of bacterial community structure was undertaken to disentangle the role of alpha- and beta-diversity in explaining variations in process rates.

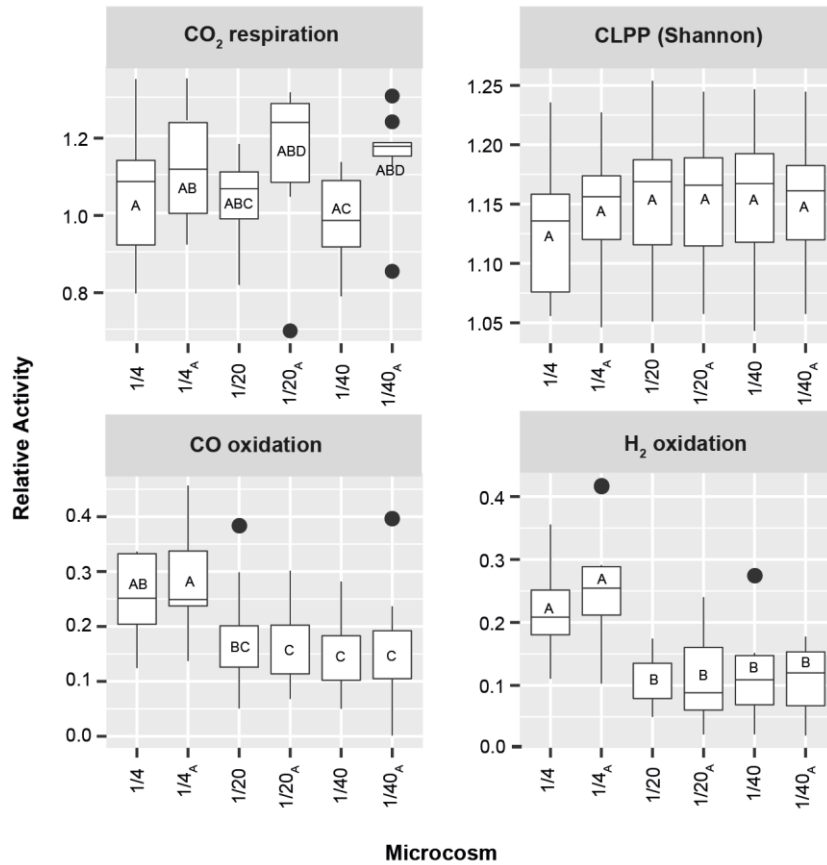


Figure 2.1. Incidence of soil treatments on microbial processes. The boxplots display measured CO₂ respiration, CLPP, CO oxidation rate and H₂ oxidation rate relative to control soil microcosms. Treatments displaying different activities (Kruskal-Wallis followed by *post doc* Dunn test) are labeled with different letters.

2.6.2 Soil microbial communities

The abundance of 16S rRNA gene copy number in microcosms subjected to biodiversity manipulation treatments was higher than control microcosms (Table S1). There is, therefore, no evidence that variation in bacterial abundance caused by biodiversity manipulation treatments was a significant factor explaining differences in microbial processes noticed in the previous section. Soil dilutions and antibiotics treatments were expected to exert incidence on bacterial species richness and evenness. Partitioning of alpha diversity into the three Hill numbers $q = 0$

for species richness, $q = 1$ for the exponential of Shannon's entropy index, and $q = 2$ for the inverse of Simpson's concentration index unveiled two distinct groups (Table 1). The first group comprised both microcosms of the 1:4 dilution, and the dilution 1:20 without antibiotics into which neither species richness nor evenness was distinguishable from control microcosms. The second group displaying a lower level of species richness and evenness than controls comprised the 1:20 dilution with antibiotics and both microcosms of the 1:40 dilution. These results indicate that reduction of alpha diversity of bacterial communities cannot account for the loss of CO and H₂ oxidation activity in the 1:4 dilution treatment and 1:20 dilution treatment without antibiotics.

Table 2.1. Number of samples, sequencing effort and alpha diversity parameters in soil microcosms. Average values are presented with standard deviation in parentheses. Different superscripts denote parameters discriminating treatments (Kruskal-Wallis followed by *post hoc* Dunn test).

Microcosm	n	Number of reads	Species richness (q=0)	Shannon's entropy index (q=1)	Inverse Simpson's index (q=2)
1/4	4	23,077 (12,210)	1,476 (79) ^a	756 (75) ^a	334 (39) ^a
1/4_A	6	23,326 (6,624)	1,423 (34) ^{ab}	678 (51) ^{ab}	266 (32) ^{ab}
1/20	7	25,526 (12,743)	1,139 (37) ^{bc}	417 (29) ^{abc}	149 (18) ^{bc}
1/20_A	5	22,252 (13,890)	967 (90) ^d	292 (51) ^d	107 (17) ^{cd}
1/40	8	28,075 (12,725)	1,029 (53) ^{cde}	380 (39) ^{cde}	149 (32) ^{cde}
1/40_A	2	25,095 (3,026)	981 (5) ^{cde}	306 (22) ^{cde}	111 (12) ^{cde}
Control	4	26,618 (17,799)	1,378 (61) ^{abc}	830 (43) ^{ab}	476 (33) ^{ab}

Soil bacterial communities were dominated by Proteobacteria (41%), Actinobacteria (22%), Bacteroidetes (11%) and Acidobacteria (10%). The response of ASV clustered into the ecologically-relevant copiotrophic and oligotrophic groups showed no evidence for preferential colonization of sterile soil by copiotrophic bacteria (Figure S1). For instance, the relative

abundance of the oligotrophic phylum Acidobacteria observed in microcosms subjected to biodiversity manipulation treatment was not distinguishable from control soil microcosms (Kruskal-Wallis, $p > 0.05$). Similarly, the distribution of ASV belonging to Bacteroides and Beta-Proteobacteria identified as copiotrophic bacteria was not influenced by dilution and antibiotic treatments. In contrast to the distribution of ASV clustered in ecologically-relevant groups, an analysis of bacterial communities at the ASV level unveiled a significant response to biodiversity manipulation treatments. The dilution treatment explained 22% of the variation in bacterial community profiles, while the block effect and antibiotics explained 12% and 9% of the variation (Figure 2A). The impact of soil treatments was further supported by the ordination of the bacterial community profile in the reduced space of a PCoA explaining 43% of their divergence (Figure 2B). The dilution treatments explain distribution of the microcosms along the first axis while the second axis discriminates the three independent incubations (block effect). Distribution of the samples along the second axis displayed an increasing dispersion as a function of dilution treatment. This observation was further supported by a beta-dispersion analysis showing that variability of replicated profiles from the same treatment increases with the dilution level (Figure 2C). Finally, the average Bray-Curtis distance separating each microcosm from the control was computed (Figure 2D), and used to generate models testing the covariation between the composition of bacterial communities and process rates in soil.

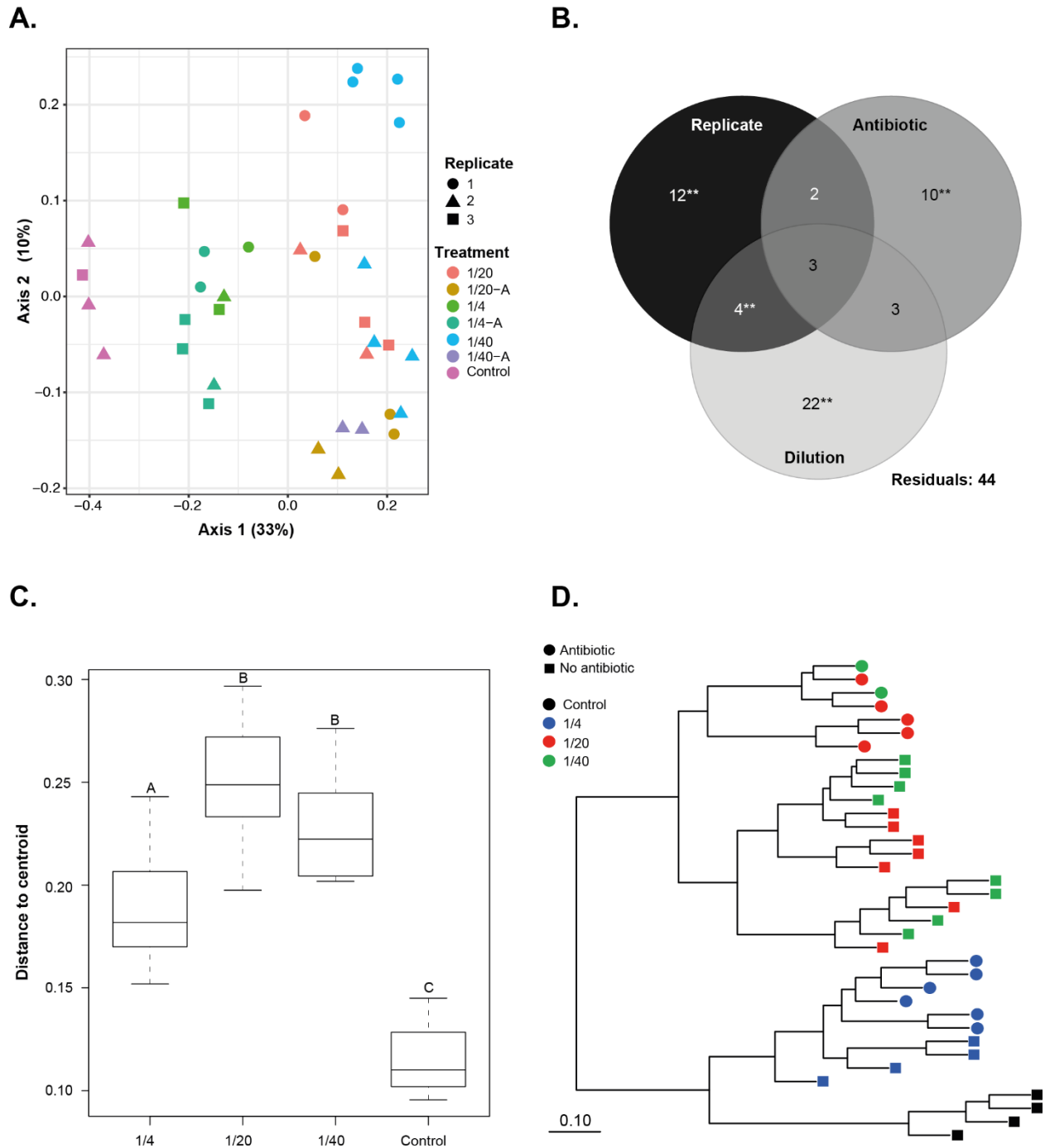


Figure 2.2. Incidence of soil treatments on bacterial community structure. (A) PCoA of the bacterial community profiles represented by point with different colors and shapes distinguishing treatments and replicates, respectively. (B) Relative contribution of dilution, antibiotic and incubation in explaining variations in bacterial community structure (PERMANOVA, with asterisks denoting significant factors at $P < 0.01$). (C) Beta dispersion of replicates among each treatment with different letter representing treatment showing significant intra variability. (D) UPGMA

dendrogram derived from the Bray Curtis distance between each sample with different colors and shapes distinguishing dilution and antibiotic treatment, respectively

2.6.3 Relationship between composition of bacterial communities and process rates in soil

Single linear regression models were computed to test the impact of modified microbial community structure driven by dilution and antibiotics treatments on process rates. Alterations in microbial community composition in soil explained neither variations in CO₂ net respiration (Figure 3A) nor and CLPP (Figure 3B). In contrast, variation in CO (Figure 3C) and H₂ (Figure 3D) oxidation activities were explained by the model, with an increasing loss of activity as a function of intensification in alterations of microbial community profiles. This supports the notion that specialist functions are more sensitive to the compositional change of bacterial communities than generalist functions. Furthermore, comparison of the slope of H₂ and CO oxidation activities models suggests that high-affinity H₂-oxidizing bacteria are slightly more sensitive than high-affinity CO-oxidizing bacteria to shifts in biodiversity.

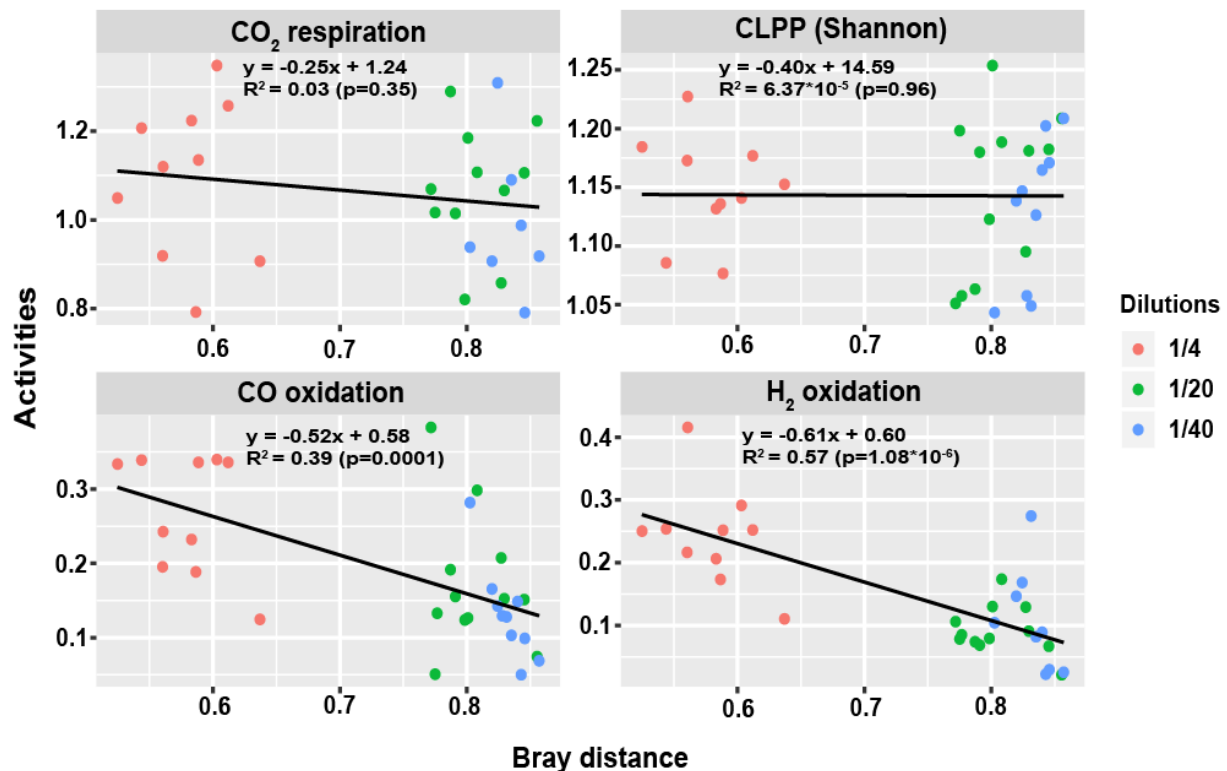


Figure 2.3. Covariation in microbial processes and taxonomic composition in soil microcosms. Variation in CO₂ respiration, CLPP, CO and H₂ uptake was explained by variation in bacterial community structure expressed as the Bray Curtis distance from control microcosms using linear regression.

2.7 Discussion

Dilution to extinction is a meaningful approach to relate soil microbial biodiversity to biogeochemical process rates and their resistance to disturbance. Intuitively, dilution of multispecies microbial consortia before inoculation is assumed to remove rare species, which is arguably supported by the loss of species proportional to dilution factor (Wertz *et al.*, 2006). However, this assumption must be cautiously taken since dilutions also exert incidence on dominant species for which proliferation is driven by interactions with other members of the community and compounds transferred with the inoculum (Howard *et al.*, 2017). Alteration of dominating species points to evenness as another relevant component driving the biodiversity-ecosystem functioning relationship. Indeed, evenness of microbial communities promotes resistance of processes to disturbance, especially in the case of selective pressure compromising the fitness of the few dominating representatives of the functional guild (Wittebolle *et al.*, 2009). In this study, a combination of moderate dilution and antibiotic treatments was selected to reduce the massive loss of rare species, while altering evenness of the communities. Moderate diversity impairment was selected owing to the importance of this phenomenon in different anthropic disturbance of soil microbial diversity as land-use change showed to exert more effect on the microbial community structure than the species richness (Carvalho *et al.*, 2016; Crowther *et al.*, 2014; da C Jesus *et al.*, 2009). Indistinguishable species richness and evenness between treatments and control microcosms supported the relevance of moderate dilution treatments, but the antibiotic combination was insufficient to change evenness through selective enrichment of resistant species. Although moderate dilution treatments using intact soil rather than suspensions were expected to enable sterile soil colonisation by most of the bacteria thriving in native soil, beta dispersion analyses showed an increasing trend of bacterial community heterogeneity among replicates as a function of dilution. The smaller the amount of inoculum relative to sterile soil; the higher the heterogeneity of replicates. Nevertheless, dilution and antibiotic treatments

both exerted a significant incidence on the composition of bacterial communities. A significant block effect, stronger than the antibiotic treatment, was observed and potentially explained by the three independent inoculants collected in April, July and September for the incubation series owing to seasonal successions of soil microbial community (Lipson *et al.*, 2009).

Both generalist functions involved in carbon cycling were slightly stimulated, while oxidation of CO and H₂ specialist functions decreased in the response to changes in microbial community structure. The exact mechanism explaining enhanced CO₂ respiration in 1:20 and 1:40 dilution microcosms amended with antibiotics is unknown, but similar observations were reported in soil amended with tetracycline, ciprofloxacin, sulfamonomethoxine and combined application (Ma *et al.*, 2014). Dilution and antibiotic treatments promoted diversification of CLPP in soil. Similar results were obtained in a previous study where soil microcosms were supplemented with chlortetracycline (Liu *et al.*, 2015). Processes that triggered alteration in CO₂ respiration and CLPP in response to soil microcosms treatments are multiple, encompassing sensitivity of microbial interactions controlling carbon turnover to biodiversity and antibiotics (Zhang & Zhang, 2016) as well as a priming effect caused by denaturation of organic matter during sterilisation of microcosm soil substrate and lysis of sensitive cells to supplemented antibiotic (Vaclavik *et al.*, 2004). As expected, both generalist functions were non-sensitive to modification in beta diversity, as explained by the high degree of redundancy of these functions in soil microorganisms. Indeed, the sensitivity of microbial processes mediating carbon turnover depends on substrate recalcitrance, with mineralization of labile plant residues more resistant to biodiversity loss than mineralization of recalcitrant organic matter in the soil (Baumann *et al.*, 2013; Maron *et al.*, 2018).

Recovery of CO and H₂ oxidation activities in the 1:4 dilution treatment displaying neither loss of species richness nor evenness was 30% in comparison with control microcosms. Interestingly, this loss of activity paralleled with alteration in the taxonomic composition of soil microbial community is in the same magnitude to the range of activity observed in response to environmental cues including changes in land-use or soil physicochemical properties. For instance, measurements of H₂ and CO soil uptake rates along a chronosequence encompassing vegetation colonisation of soil volcanic deposits showed that barren site displayed 19 and 35% of the activities measured the end of succession site (King *et al.*, 2008). The impact of land-use change also was observed in deciduous forest converted in maize and larch monocultures displaying 80 and 88% lower potential CO oxidation activity, respectively (Quiza *et al.*, 2014). It

is currently assumed that response of H₂ and CO oxidation activities to land-use change is triggered by modification of soil organic content that correlates with activities (Conrad & Seiler, 1985), but belowground diversity has never been considered in past investigations. In addition to land-use, pH and substrate-induced respiration explain variation in H₂ oxidation activity measured in soil (Gödde *et al.*, 2000). According to these previous models, soil displaying a pH of 6 is expected to show 22% of H₂ oxidation activity measured in a neutral pH soil, if the soil water holding capacity is 30% and both soils display the same substrate-induced respiration rate. These comparisons highlight the need to disentangle the relative contribution of soil abiotic features and microbial diversity in explaining H₂ and CO soil uptake activities. Bridging this knowledge gap could improve the resolution of temporal and spatial distribution models of atmospheric H₂ and CO concentrations into which H₂ and CO fluxes are parameterized with variables encompassing temperature, primary productivity, and land-use types.

Based on process rate measurements conducted in soil microcosms, we conclude that composition instead of richness of microbial communities drives high-affinity CO and H₂ oxidation activities in soil. The observed loss of oxidation activities begs the question of whether the composition of COB and HOB functional guilds, their mixotrophic lifestyle, or their interactions with other members of the community are drivers of H₂ and CO soil uptake activities. Addressing this question is an exciting challenge requiring innovative strategies that fall beyond conventional molecular surveys. Indeed, loamy sand soils were shown to harbor complex communities of COB and HOB represented by hundreds of genotypes (Khdhiri *et al.*, 2017; Lalonde & Constant, 2016b). Partitioning the contribution of individual genotypes to community-level process rates is hampered by the lack of information regarding cell-specific activities of each member of the communities. Furthermore, compelling experimental evidence supports the importance of microbe-microbe interactions in determining whole community process rates. The mechanisms behind such interactions are far from being elucidated, but the exchange of signaling VOC molecules was proposed to explain stimulation of CH₄ oxidation activity of methanotrophic bacteria cultivated in the presence of heterotrophic bacteria unable to scavenge methane (Ho *et al.*, 2014; Veraart *et al.*, 2018). These interactions are further complicated, owing to the mixotrophic lifestyle of microorganisms using trace gas. In the case of CO and H₂ present at the trace level, their oxidation was shown to supply survival energy requirement under starvation (Liot & Constant, 2016) or growth requirement in combination with other substrates (Greening *et al.*, 2014). Although appealing thanks to its ease of implementation, ecological classification of

bacterial phylotypes into copiotrophic or oligotrophic communities (Fierer *et al.*, 2007) was not a good proxy to integrate potential fitness supported by trace gas in microcosms examined in this study. The use of synthetic communities is seen as a promising avenue to complement the effort of diversity erosion experiments aimed at determining the relationship between microbial diversity and functioning in soil.

2.8 Acknowledgement

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada [Discovery grant number RGPIN-2018-05262] to P.C. The authors acknowledge use of McGill University and Génome Québec Innovation Centre for 16S rRNA PCR amplicon sequencing service.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude de la biodiversité et du fonctionnement des écosystèmes est un enjeu crucial en ce 21^e siècle vu le rythme élevé d'extinction d'espèces et l'effet des changements globaux actuels et attendus. La grande richesse spécifique caractérisant les écosystèmes microbiens complexes tels que le sol a longtemps laissé croire qu'ils abritaient une redondance fonctionnelle inépuisable. Cependant, les études ont montré que la modification d'un sol, suite à des événements de pollution et de changement d'affectation, avait un impact sur les services écosystémiques qu'il procure. Au-delà des facteurs abiotiques tels que le carbone, l'azote ou le pH, il importe de connaître la part des facteurs biologiques dans les processus sur lesquels les humains dépendent. Pour ce faire, il faut élucider la complexité des écosystèmes microbiens qui relève de d'une grande abondance d'espèces combinée à leurs possibilités d'interactions directes et indirectes. Cette quête représente un réel défi compte tenu des limites technologiques et des outils d'analyses bioinformatiques et statistiques. En premier lieu, la caractérisation de la biodiversité doit se faire à l'aide d'outils sensibles, permettant de déterminer la composante qui affecte la fonction étudiée, i.e. est-ce la richesse, l'équitabilité ou la structure des communautés. Par exemple, contrairement à la majorité des études sur les BEF, notre étude a principalement modifié la bêta diversité (structure des communautés) sans influencer la richesse ni l'équitabilité et cette modification a été suffisante pour affecter certaines fonctions. Ceci montre l'importance d'avoir utilisé une érosion douce de la diversité, permettant de distinguer l'effet de la structure des communautés, impossible à isoler lorsqu'il y a une perte significative au niveau de la richesse spécifique. En second lieu, le choix des fonctions étudiées doit être justifié de façon à comprendre la sensibilité de l'écosystème à une perturbation, i.e. quel est le degré de résistance et de résilience de l'écosystème et quelles fonctions seront les premières à être affectées lors d'une perturbation. Les fonctions étudiées lors de notre expérience représentaient deux fonctions associées au cycle du carbone et effectuées par des représentants de tous les règnes du vivant, et deux fonctions effectuées par moins de 3% des bactéries du sol, permettant de distinguer le degré de sensibilité des fonctions selon un degré de redondance fonctionnel. Finalement, le choix de la composante du microbiote analysée doit être pertinent en vue de présenter des résultats permettant de répondre à la question de façon claire et précise. Le choix de notre étude s'est arrêté sur l'analyse de la structure taxonomique des communautés microbiennes en ciblant le gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARNr des bactéries. Il aurait été intéressant de caractériser les communautés fongiques ainsi que les communautés de bactéries oxydant l'H₂

et les bactéries oxydant le CO, mais des problèmes techniques et les délais entraînés par ceux-ci ne justifiaient pas l'effort lié au temps de ce projet de maîtrise. Les champignons ont été négligés puisqu'à ce jour, aucune espèce fongique ayant la machinerie enzymatique nécessaire à l'oxydation de l'H₂ ou du CO n'a été répertoriée. Par ailleurs, l'analyse des gènes fonctionnels liés à l'oxydation de l'H₂ ou du CO, bien que pertinente, n'aurait pas permis de mettre en lumière le ou les mécanismes exacts entraînant une modification des activités mesurées. Ces derniers impliqueraient potentiellement un changement métabolique chez les espèces mixotrophes utilisant davantage le carbone organique du sol que l'H₂ et le CO dans les microcosmes ou bien une perte de l'activité des BOH et des BOC causée par des interactions interspécifiques. Tout changement de profil de diversité fonctionnel des BOH ou des BOC observé par des techniques de séquençage d'amplicons PCR, suite aux traitements appliqués aux microcosmes, aurait été insuffisant pour assurer un lien de causalité entre la perte de génotypes et la perte d'activité. Les approches futures devront se pencher sur la mise au point de techniques permettant d'analyser les processus à l'échelle de la cellule (e.g. utilisation d'isotopes stables combinés à la technologie du Nano-SIMS). Suivant cette approche, il serait alors possible d'identifier les microorganismes participant aux processus mesurés, ainsi que la proportion d'activité qu'ils prennent en charge.

En résumé, ce projet de maîtrise a permis de montrer que l'oxydation de l'H₂ et du CO diminuent de façon significative lorsqu'il y a modification de la biodiversité dans un sol alors que la respiration du CO₂ et le profil d'utilisation de source de carbone par les communautés microbiennes ont tendance à augmenter. Il serait intéressant de confirmer que ces mêmes fonctions auront la même réponse à la modification de biodiversité dans plusieurs sols forestiers ainsi qu'une analyse plus approfondie tenant compte de plusieurs types de sols. Finalement, un autre volet à explorer serait l'étude de la résilience des processus ayant été altérés par la modification de la composition taxonomique des communautés microbiennes des microcosmes de sol. Une prolongation de la durée totale de chaque bloc de l'expérience qui était de 41 jours, permettrait de voir s'il y a un retour à l'équilibre répondant par le rétablissement total des fonctions mesurées avec ou sans l'ajout de nouvelles espèces et ou d'amendements en nutriments.

Bibliographie

- Adhikari K & Hartemink AE (2016) Linking soils to ecosystem services—A global review. *Geoderma* 262:101-111.
- Allison SD & Martiny JB (2008) Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *PNAS* 105:11512-11519.
- Asner GP, Rudel TK, Aide TM, DeFries R & Emerson R (2009) A contemporary assessment of change in humid tropical forests. *Conserv. Biol.* 23:1386-1395.
- Assessment ME (2005) Millennium ecosystem assessment synthesis report. (Island Press Washington, DC).
- Atlas RM, Horowitz A, Krichevsky M & Bej AK (1991) Response of microbial populations to environmental disturbance. *Microb. Ecol.* 22:249-256.
- Baas-Becking LGM (1934) *Geobiologie; of inleiding tot de milieukunde*. WP Van Stockum & Zoon NV, 1934
- Baumann K, Dignac M-F, Rumpel C, Bardoux G, Sarr A, Steffens M & Maron P-A (2013) Soil microbial diversity affects soil organic matter decomposition in a silty grassland soil. *Biogeochemistry* 114:201-212.
- Bell T, Newman JA, Silverman BW, Turner SL & Lilley AK (2005) The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature* 436:1157.
- Blankinship JC, Niklaus PA & Hungate BA (2011) A meta-analysis of responses of soil biota to global change. *Oecologia* 165:553-565.
- Blum WE (2005) Functions of soil for society and the environment. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 4:75-79.
- Bray JR & Curtis JT (1957) An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.* 27:325-349.
- Callahan BJ, McMurdie PJ & Holmes SP (2017) Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J.* (12):2639.
- Cao C, Zhang Y, Qian W, Liang C, Wang C & Tao S (2017) Land-use changes influence soil bacterial communities in a meadow grassland in Northeast China. *Solid Earth* 8:1119-1129.
- Carson JK, Campbell L, Rooney D, Clipson N & Gleeson DB (2009) Minerals in soil select distinct bacterial communities in their microhabitats. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67:381-388.
- Carson JK, Gonzalez-Quiñones V, Murphy DV, Hinz C, Shaw JA & Gleeson DB (2010) Low pore connectivity increases bacterial diversity in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:3936-3942.
- Carvalho TS, Jesus EdC, Barlow J, Gardner TA, Soares IC, Tiedje JM & Moreira FMdS (2016) Land use intensification in the humid tropics increased both alpha and beta diversity of soil bacteria. *Ecology* 97:2760-2771.
- Chao A (1984) Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand. Stat. Theory App.* 11:265-270.
- Chao A, Gotelli NJ, Hsieh T, Sander EL, Ma K, Colwell RK & Ellison AM (2014) Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecol. Monogr.* 84:45-67.
- Chen H & Boutros PC (2011) VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC bioinformatics* 12:35.
- Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, Brown CT, Porras-Alfaro A, Kuske CR & Tiedje JM (2013) Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 42:D633-D642.

- Comeau S, Jeffree R, Teyssié J-L & Gattuso J-P (2010) Response of the Arctic pteropod *Limacina helicina* to projected future environmental conditions. *PLoS one* 5:e11362.
- Conrad R (1996) Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 60:609-640.
- Conrad R & Seiler W (1985) Influence of temperature, moisture, and organic carbon on the flux of H₂ and CO between soil and atmosphere: Field studies in subtropical regions. *J Geophys. Res. Atmos.* 90:5699-5709.
- Constant P, Chowdhury SP, Pratscher J & Conrad R (2010) Streptomyces contributing to atmospheric molecular hydrogen soil uptake are widespread and encode a putative high-affinity [NiFe]-hydrogenase. *Environ. Microbiol.* 12(3):821-829.
- Crowther TW, Maynard DS, Leff JW, Oldfield EE, McCulley RL, Fierer N & Bradford MA (2014) Predicting the responsiveness of soil biodiversity to deforestation: a cross-biome study. *Glob. Chang. Biol.* 20:2983-2994.
- Curtis TP & Sloan WT (2004) Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Curr. Opin. Microbiol.* 7:221-226.
- da C Jesus E, Marsh TL, Tiedje JM & de S Moreira FM (2009) Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. *ISME J.* 3:1004.
- Dash MC (2001) *Fundamentals of ecology*. Tata McGraw-Hill Education,
- Dechesne A, Or D & Smets BF (2008) Limited diffusive fluxes of substrate facilitate coexistence of two competing bacterial strains. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64:1-8.
- Degens BP (1998) Decreases in microbial functional diversity do not result in corresponding changes in decomposition under different moisture conditions. *Soil Biol. Biochem.* 30:1989-2000.
- Delgado-Baquerizo M, Maestre FT, Reich PB, Jeffries TC, Gaitan JJ, Encinar D, Berdugo M, Campbell CD & Singh BK (2016) Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. *Nat. Commun.* 7:10541.
- Dell'Anno A, Beolchini F, Rocchetti L, Luna GM & Danovaro R (2012) High bacterial biodiversity increases degradation performance of hydrocarbons during bioremediation of contaminated harbor marine sediments. *Environ. Pollut.* 167:85-92.
- Dinno A (2017) *dunn.test: Dunn's Test of Multiple Comparisons Using Rank Sums*. <https://CRAN.R-project.org/package=dunn.test> (Consulté e Date Accessed)
- Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26:2460-2461.
- Edgar RC (2016) UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing. *BioRxiv* :081257.
- Elshahed MS, Youssef NH, Spain AM, Sheik C, Najar FZ, Sukharnikov LO, Roe BA, Davis JP, Schloss PD & Bailey VL (2008) Novelty and uniqueness patterns of rare members of the soil biosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:5422-5428.
- Fernández A, Huang S, Seston S, Xing J, Hickey R, Criddle C & Tiedje J (1999) How stable is stable? Function versus community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3697-3704.
- Field DJ, Morgan CL & McBratney AB (2016) *Global Soil Security*. Springer,
- Fierer N, Bradford MA & Jackson RB (2007) Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88:1354-1364.
- Fierer N, Jackson JA, Vilgalys R & Jackson RB (2005) Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:4117-4120.
- Fierer N, Lauber CL, Ramirez KS, Zaneveld J, Bradford MA & Knight R (2012) Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *ISME J.* 6:1007-1017.

- Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA & Olsen GJ (2008) Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:2461-2470.
- Friesen ML, Saxer G, Travisano M & Doebeli M (2004) Experimental evidence for sympatric ecological diversification due to frequency-dependent competition in *Escherichia coli*. *Evolution* 58:245-260.
- Galand PE, Casamayor EO, Kirchman DL & Lovejoy C (2009) Ecology of the rare microbial biosphere of the Arctic Ocean. *PNAS* :pnas. 0908284106.
- Galloway JN, Dentener FJ, Capone DG, Boyer EW, Howarth RW, Seitzinger SP, Asner GP, Cleveland CC, Green P & Holland EA (2004) Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry* 70:153-226.
- Gaston KJ (2008) Biodiversity and extinction: the importance of being common. *Prog. Phys. Geogr.* 32:73-79.
- Giovannoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL & Field KG (1990) Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345:60.
- Girvan M, Campbell C, Killham K, Prosser JI & Glover LA (2005) Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environ. Microbiol.* 7:301-313.
- Gödde M, Meuser K & Conrad R (2000) Hydrogen consumption and carbon monoxide production in soils with different properties. *Biol. Fertil. Soils* 32:129-134.
- Greening C, Berney M, Hards K, Cook GM & Conrad R (2014) A soil actinobacterium scavenges atmospheric H₂ using two membrane-associated, oxygen-dependent [NiFe] hydrogenases. *PNAS* 111:4257-4261.
- Greening C, Biswas A, Carere CR, Jackson CJ, Taylor MC, Stott MB, Cook GM & Morales SE (2016) Genomic and metagenomic surveys of hydrogenase distribution indicate H₂ is a widely utilised energy source for microbial growth and survival. *ISME J.* 10:761.
- Greening C, Carere CR, Rushton-Green R, Harold LK, Hards K, Taylor MC, Morales SE, Stott MB & Cook GM (2015) Persistence of the dominant soil phylum Acidobacteria by trace gas scavenging. *PNAS* 112(33):10497-10502.
- Griffiths B, Ritz K, Bardgett RD, Cook R, Christensen S, Ekelund F, Sørensen S, Bååth E, Bloem J & De Ruiter P (2000) Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity–ecosystem function relationship. *Oikos* 90:279-294.
- Griffiths RI, Thomson BC, James P, Bell T, Bailey M & Whiteley AS (2011) The bacterial biogeography of British soils. *Environ. Microbiol.* 13:1642-1654.
- Group CASCCSCW, Canada NRC, Agriculture C & Branch A-FCR (1998) *The Canadian system of soil classification*. NRC Research Press,
- Ho A, De Roy K, Thas O, De Neve J, Hoefman S, Vandamme P, Heylen K & Boon N (2014) The more, the merrier: heterotroph richness stimulates methanotrophic activity. *ISME J.* 8:1945.
- Ho A, Lüke C & Frenzel P (2011) Recovery of methanotrophs from disturbance: population dynamics, evenness and functioning. *ISME J* 5:750.
- Hooper DU, Chapin F, Ewel JJ, Hector A, Inchausti P, Lavorel S, Lawton JH, Lodge D, Loreau M & Naeem S (2005) Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecol. Monograph.* 75:3-35.
- Howard MM, Bell TH & Kao-Kniffin J (2017) Soil microbiome transfer method affects microbiome composition, including dominant microorganisms, in a novel environment. *FEMS Microbiol. Lett.* 364.
- Hsieh T, Ma K & Chao A (2016) iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Methods Ecol. Evol.* 7:1451-1456.

- Islam ZF, Cordero PRF, Feng J, Chen YJ, Bay SK, Jirapanjawan T, Gleadow RM, Carere CR, Stott MB, Chiri E & Greening C (2019) Two Chloroflexi classes independently evolved the ability to persist on atmospheric hydrogen and carbon monoxide. *ISME J.* 10.1038/s41396-019-0393-0.
- Khdhiri M, Hesse L, Popa ME, Quiza L, Lalonde I, Meredith LK, Röckmann T & Constant P (2015a) Soil carbon content and relative abundance of high affinity H₂-oxidizing bacteria predict atmospheric H₂ soil uptake activity better than soil microbial community composition. *Soil Biol. Biochem.* 85:1-9.
- Khdhiri M, Hesse L, Popa ME, Quiza L, Lalonde I, Meredith LK, Röckmann T & Constant P (2015b) Soil carbon content and relative abundance of high affinity H₂-oxidizing bacteria predict atmospheric H₂ soil uptake activity better than soil microbial community composition. *Soil Biol. Biochem.* 85:1-9.
- Khdhiri M, Piche-Choquette S, Tremblay J, Tringe SG & Constant P (2017) The tale of a neglected energy source: elevated hydrogen exposure affects both microbial diversity and function in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 83.
- Kim M, Oh H-S, Park S-C & Chun J (2014) Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *J. Syst. Evol. Microbiol.* 64:346-351.
- King GM & Weber CF (2007) Distribution, diversity and ecology of aerobic CO-oxidizing bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 5:107.
- King GM, Weber CF, Nanba K, Sato Y & Ohta H (2008) Atmospheric CO and hydrogen uptake and CO oxidizer phylogeny for Miyake-jima, Japan volcanic deposits. *Microbes Environ.* 23:299-305.
- Kissinger G, Herold M & De Sy V (2012) Drivers of deforestation and forest degradation: a synthesis report for REDD+ policymakers. (Lexeme Consulting).
- Kowalchuk GA, Buma DS, de Boer W, Klinkhamer PG & van Veen JA (2002) Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:509-520.
- Krause S, Le Roux X, Niklaus PA, Van Bodegom PM, Lennon JT, Bertilsson S, Grossart H-P, Philippot L & Bodelier PL (2014) Trait-based approaches for understanding microbial biodiversity and ecosystem functioning. *Front. Microbiol.* 5:251.
- Krsek M & Wellington E (1999) Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *J. Microbiol. Methods* 39:1-16.
- Kutílek M & Nielsen DR (2015) Soil Is the Skin of the Planet Earth. *Soil*, Springer. p 13-19.
- Lalonde I & Constant P (2016a) Identification of unknown carboxydovore bacteria dominant in deciduous forest soil via succession of bacterial communities, coxI genotypes, and carbon monoxide oxidation activity in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 82:1324-1333.
- Lalonde I & Constant P (2016b) Identification of unknown carboxydovore bacteria dominant in deciduous forest soil via succession of bacterial communities, coxL genotypes, and carbon monoxide oxidation activity in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 82:1324-1333.
- Langenheder S, Lindström ES & Tranvik LJ (2005) Weak coupling between community composition and functioning of aquatic bacteria. *Limnol. Oceanogr.* 50:957-967.
- Langenheder S, Lindström ES & Tranvik LJ (2006) Structure and function of bacterial communities emerging from different sources under identical conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:212-220.
- Lauber CL, Hamady M, Knight R & Fierer N (2009) Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:5111-5120.

- Lee-Cruz L, Edwards DP, Tripathi BM & Adams JM (2013) The impact of logging and forest conversion to oil palm on soil bacterial communities in Borneo. *Appl. Environ. Microbiol.* 02541-02513.
- Leff JW, Jones SE, Prober SM, Barberán A, Borer ET, Firm JL, Harpole WS, Hobbie SE, Hofmockel KS & Knops JM (2015) Consistent responses of soil microbial communities to elevated nutrient inputs in grasslands across the globe. *PNAS* 112:10967-10972.
- Legendre P & Gallagher E (2001) Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia* 129:271-280.
- Legendre P & Legendre L (1998) Numerical Ecology, Volume 24, (Developments in Environmental Modelling). (Elsevier Science Amsterdam, The Netherlands).
- Lehmann J, Solomon D, Kinyangi J, Dathe L, Wirrick S & Jacobsen C (2008) Spatial complexity of soil organic matter forms at nanometre scales. *Nat. Geosci.* 1:238.
- Levine UY, Teal TK, Robertson GP & Schmidt TM (2011) Agriculture's impact on microbial diversity and associated fluxes of carbon dioxide and methane. *ISME J.* 5:1683.
- Liot Q & Constant P (2016) Breathing air to save energy—new insights into the ecophysiological role of high-affinity [NiFe]-hydrogenase in *Streptomyces avermitilis*. *MicrobiologyOpen* 5:47-59.
- Lipson DA, Monson RK, Schmidt SK & Weintraub MN (2009) The trade-off between growth rate and yield in microbial communities and the consequences for under-snow soil respiration in a high elevation coniferous forest. *Biogeochemistry* 95:23-35.
- Liu B, Li Y, Zhang X, Wang J & Gao M (2015) Effects of chlortetracycline on soil microbial communities: Comparisons of enzyme activities to the functional diversity via Biolog EcoPlates™. *Eur. J. Soil. Biol.* 68:69-76.
- Locey KJ & Lennon JT (2016) Scaling laws predict global microbial diversity. *PNAS* 113:5970-5975.
- Loreau M (2000) Biodiversity and ecosystem functioning: recent theoretical advances. *Oikos* 91:3-17.
- Louca S, Jacques SM, Pires AP, Leal JS, Srivastava DS, Parfrey LW, Farjalla VF & Doebeli M (2017) High taxonomic variability despite stable functional structure across microbial communities. *Nat. Ecol. Evol.* 1:0015.
- Louca S, Parfrey LW & Doebeli M (2016) Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. *Science* 353:1272-1277.
- Lynch MD, Bartram AK & Neufeld JD (2012) Targeted recovery of novel phylogenetic diversity from next-generation sequence data. *ISME J.* 6:2067.
- Ma J, Lin H, Sun W, Wang Q, Yu Q, Zhao Y & Fu J (2014) Soil microbial systems respond differentially to tetracycline, sulfamonomethoxine, and ciprofloxacin entering soil under pot experimental conditions alone and in combination. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21:7436-7448.
- Magurran AE (2013) *Measuring biological diversity*. Blackwell, Oxford, United Kingdom.
- Maron P-A, Sarr A, Kaisermann A, Lévêque J, Mathieu O, Guigue J, Karimi B, Bernard L, Dequiedt S & Terrat S (2018) High microbial diversity promotes soil ecosystem functioning. *Appl. Environ. Microbiol.* 02738-02717.
- McMurdie PJ & Holmes S (2013) phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE* 8(4):e61217.
- McNamara N, Black H, Beresford N & Parekh N (2003) Effects of acute gamma irradiation on chemical, physical and biological properties of soils. *Appl. Soil. Ecol.* 24:117-132.
- Monks PS (2005) Gas-phase radical chemistry in the troposphere. *Chem. Soc. Rev.* 34:376-395.
- Montoya JP, Holl CM, Zehr JP, Hansen A, Villareal TA & Capone DG (2004) High rates of N₂ fixation by unicellular diazotrophs in the oligotrophic Pacific Ocean. *Nature* 430:1027.
- Nelson MB, Martiny AC & Martiny JB (2016) Global biogeography of microbial nitrogen-cycling traits in soil. *PNAS* 113:8033-8040.

- Novelli PC, Lang PM, Masarie KA, Hurst DF, Myers R & Elkins JW (1999) Molecular hydrogen in the troposphere: Global distribution and budget. *J. Geophys. Res. Atmos.* 104:30427-30444.
- Novelli PC, Masarie KA & Lang PM (1998) Distributions and recent changes of carbon monoxide in the lower troposphere. *J. Geophys. Res. Atmos.* 103(D15):19015-19033.
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'hara R, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH & Wagner H (2013) Package 'vegan'. *Community ecology package, version 2*.
- Or D, Smets BF, Wraith J, Dechesne A & Friedman S (2007) Physical constraints affecting bacterial habitats and activity in unsaturated porous media—a review. *Adv. Water. Resour.* 30:1505-1527.
- Pace NR, Stahl DA, Lane DJ & Olsen GJ (1986) The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microb. Ecol.*, Springer. p 1-55.
- Papke RT, Ramsing NB, Bateson MM & Ward DM (2003) Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. *Environ. Microbiol.* 5:650-659.
- Pedrós-Alió C (2006) Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends Microbiol.* 14:257-263.
- Pester M, Bittner N, Deevong P, Wagner M & Loy A (2010) A 'rare biosphere' microorganism contributes to sulfate reduction in a peatland. *ISME J.* 4:1591.
- Petchey OL & Gaston KJ (2006) Functional diversity: back to basics and looking forward. *Ecol. Lett.* 9:741-758.
- Philippot L, Spor A, Hénault C, Bru D, Bizouard F, Jones CM, Sarr A & Maron P-A (2013) Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. *ISME J.* 7:1609.
- Quiza L, Lalonde I, Guertin C & Constant P (2014) Land-use influences the distribution and activity of high affinity CO-oxidizing bacteria associated to type I-coxL genotype in soil. *Front. Microbiol.* 5:271.
- Rainey PB & Travisano M (1998) Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature* 394:69.
- Rajaniemi T & Allison V (2009) Abiotic conditions and plant cover differentially affect microbial biomass and community composition on dune gradients. *Soil Biol. Biochem.* 41:102-109.
- Ranjard L & Richaume A (2001) Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Res. Microbiol.* 152:707-716.
- Reed HE & Martiny JB (2007) Testing the functional significance of microbial composition in natural communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62:161-170.
- Reid A & Buckley M (2011) *The rare biosphere*. ASM Press, Washington DC
- Rivett DW & Bell T (2018) Abundance determines the functional role of bacterial phylotypes in complex communities. *Nat. Microbiol.* 3:767-772.
- Roesch LF, Fulthorpe RR, Riva A, Casella G, Hadwin AK, Kent AD, Daroub SH, Camargo FA, Farmerie WG & Triplett EW (2007) Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J.* 1:283.
- Rosselló-Mora R & Amann R (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 25:39-67.
- Schluter D (2000) *The ecology of adaptive radiation*. OUP Oxford,
- Seddon N, Mace GM, Naeem S, Tobias JA, Pigot AL, Cavanagh R, Mouillot D, Vause J & Walpole M (2016) Biodiversity in the Anthropocene: prospects and policy. *Proc. Biol. Sci.* 283:20162094.
- Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Welch DM, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM & Herndl GJ (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *PNAS* 103:12115-12120.
- Team RC (2013) R: A language and environment for statistical computing.

- Thiele-Bruhn S & Beck I-C (2005) Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. *Chemosphere* 59:457-465.
- Treves D, Xia B, Zhou J & Tiedje J (2003) A two-species test of the hypothesis that spatial isolation influences microbial diversity in soil. *Microb. Ecol.* 45:20-28.
- Tyson GW, Lo I, Baker BJ, Allen EE, Hugenholtz P & Banfield JF (2005) Genome-directed isolation of the key nitrogen fixer *Leptospirillum ferrodiazotrophum* sp. nov. from an acidophilic microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6319-6324.
- Vaclavik E, Halling-Sørensen B & Ingerslev F (2004) Evaluation of manometric respiration tests to assess the effects of veterinary antibiotics in soil. *Chemosphere* 56:667-676.
- van Elsas JD, Chiurazzi M, Mallon CA, Elhottová D, Křišťůfek V & Salles JF (2012) Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. *PNAS* 109:1159-1164.
- Veraart A, Garbeva P, Beersum Fv, Ho A, Hordijk C, Meima-Franke M, Zweers A & Bodelier P (2018) Living apart together—bacterial volatiles influence methanotrophic growth and activity. *ISME J.* 12:1163-1166.
- Vos M, Wolf AB, Jennings SJ & Kowalchuk GA (2013) Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil. *FEMS Microbiol. Rev.* 37:936-954.
- Wang R, Balkanski Y, Boucher O, Ciais P, Peñuelas J & Tao S (2015) Significant contribution of combustion-related emissions to the atmospheric phosphorus budget. *Nat. Geosci.* 8:48.
- Wertz S, Degrange V, Prosser JI, Poly F, Commeaux C, Freitag T, Guillaumaud N & Roux XL (2006) Maintenance of soil functioning following erosion of microbial diversity. *Environ. Microbiol.* 8:2162-2169.
- Wertz S, Degrange V, Prosser JI, Poly F, Commeaux C, Guillaumaud N & Le Roux X (2007) Decline of soil microbial diversity does not influence the resistance and resilience of key soil microbial functional groups following a model disturbance. *Environ. Microbiol.* 9:2211-2219.
- Whitaker RJ, Grogan DW & Taylor JW (2003) Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science* 301:976-978.
- Whittaker RH (1972) Evolution and measurement of species diversity. *Taxon* :213-251.
- Wickham H (2011) The split-apply-combine strategy for data analysis. *Journal of Statistical Software* 40(1):1-29.
- Wickham H (2016) *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York
- Wittebolle L, Marzorati M, Clement L, Balloi A, Daffonchio D, Heylen K, De Vos P, Verstraete W & Boon N (2009) Initial community evenness favours functionality under selective stress. *Nature* 458:623.
- Wood SA, Gilbert JA, Leff JW, Fierer N, D'Angelo H, Bateman C, Gedallovich SM, Gillikin CM, Gradoville MR & Mansor P (2017) Consequences of tropical forest conversion to oil palm on soil bacterial community and network structure. *Soil Biol. Biochem.* 112:258-268.
- Yachi S & Loreau M (1999) Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: the insurance hypothesis. *PNAS* 96:1463-1468.
- Yan Y, Kuramae EE, Klinkhamer PG & van Veen JA (2015) The dilution procedure to manipulate microbial biodiversity in terrestrial systems revisited. *Appl. Environ. Microbiol.* 00958-00915.
- Young IM & Crawford JW (2004) Interactions and self-organization in the soil-microbe complex. *Science* 304:1634-1637.
- Youssef N, Steidley BL & Elshahed MS (2012) Novel high-rank phylogenetic lineages within a sulfur spring (Zodletone spring, Oklahoma, USA) revealed using a combined pyrosequencing/Sanger approach. *Appl. Environ. Microbiol.* 00002-00012.
- Zhang F-G & Zhang Q-G (2016) Microbial diversity limits soil heterotrophic respiration and mitigates the respiration response to moisture increase. *Soil Biol. Biochem* 98:180-185.

Zhou J, Xia B, Treves DS, Wu L-Y, Marsh TL, O'Neill RV, Palumbo AV & Tiedje JM (2002) Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:326-334.