

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre Institut Armand Frappier

Développement d'outils moléculaires pour la détection et quantification des bactéries oxydant le CO atmosphérique et identification des facteurs environnementaux régulant leur distribution et leur activité

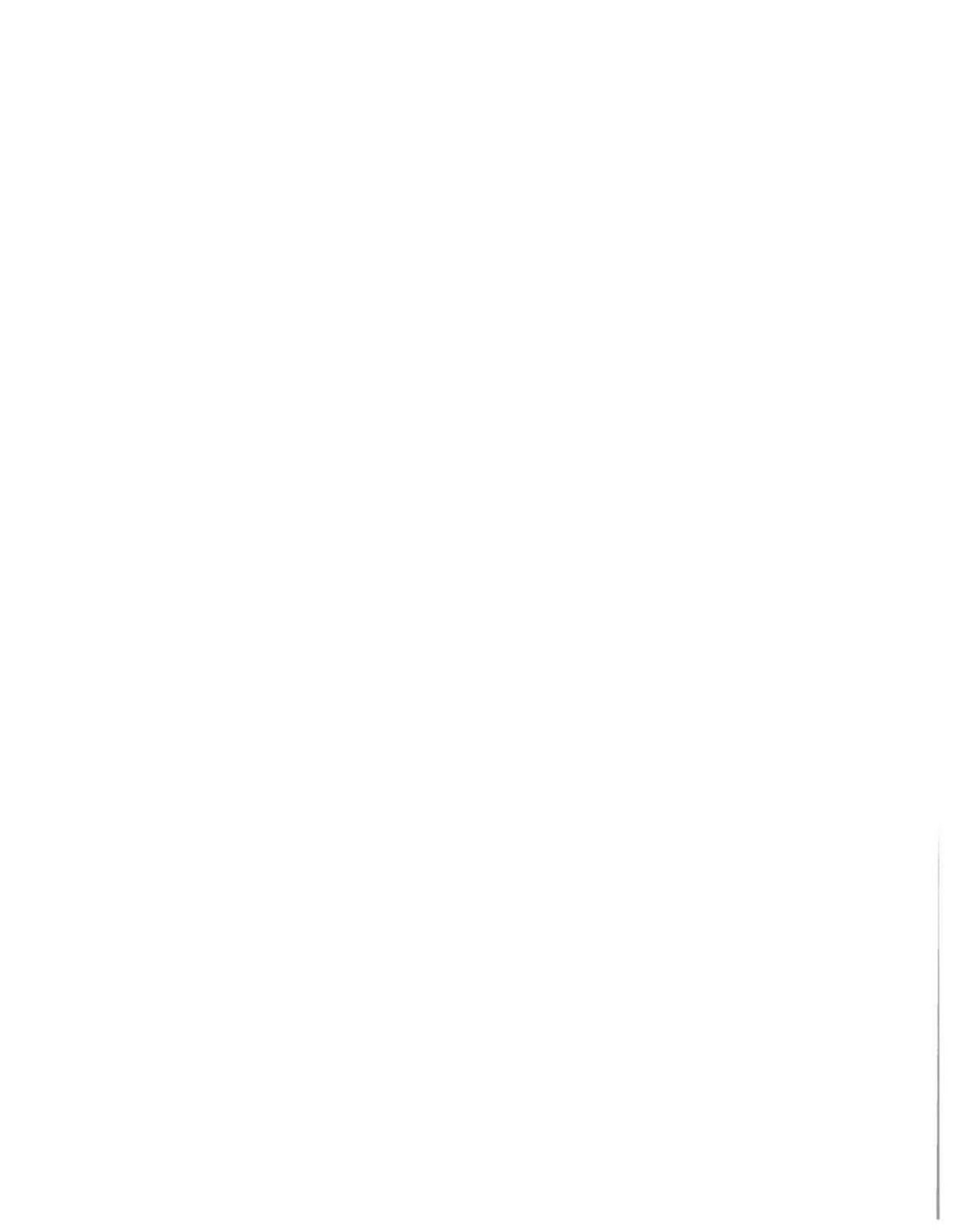
Par

Liliana Quiza Moreno

Mémoire présentée pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
Microbiologie Appliquée

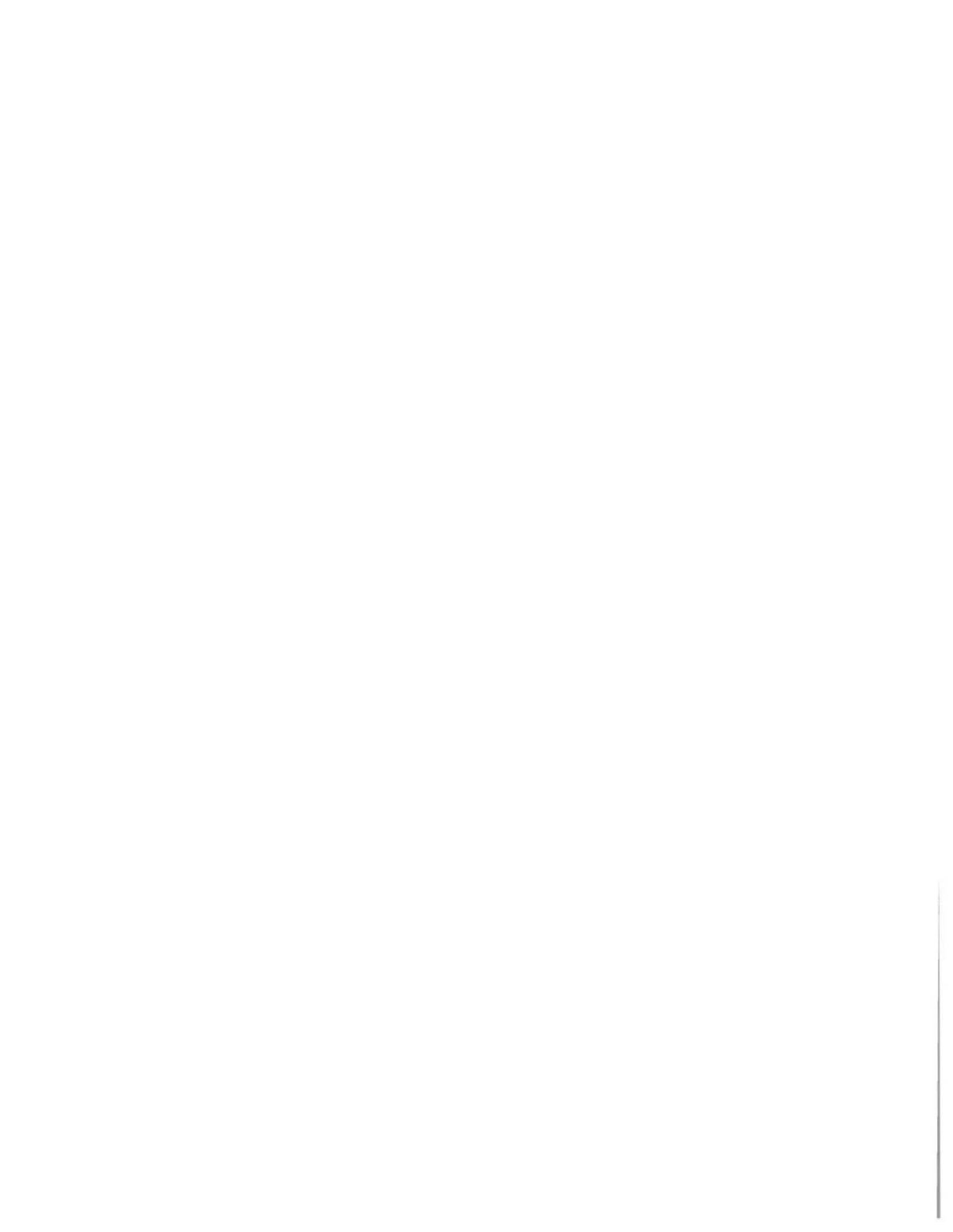
Jury d'évaluation

Examineur externe	Martin Chénier Faculté des Sciences Agricoles et Environnementales Université Mc Gill
Examineur interne	Richard Villemur INRS - Institut Armand Frappier
Directeur de recherche	Philippe Constant INRS – Institut Armand Frappier



RÉSUMÉ

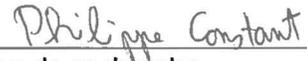
Les bactéries carboxydovores du sol séquestrent le monoxyde de carbone (CO) atmosphérique, atténuant ainsi une fraction importante de ses émissions anthropiques. L'atténuation de ces émissions de CO par le sol est une fonction biogéochimique de grande importance, puisque cette activité régule indirectement la durée de vie atmosphérique du méthane, un gaz à effet de serre puissant. Malgré leur forte implication dans la régulation du bilan radiatif terrestre, très peu de bactéries carboxydovores ont été identifiées jusqu'à maintenant. L'objectif de cette étude est de vérifier comment l'utilisation des terres influence le puits biologique du CO atmosphérique et d'identifier les bactéries carboxydovores du sol. Le projet a été élaboré pour tester l'hypothèse que la diversité des bactéries oxydant le CO est influencée par les propriétés physico-chimiques du sol et reflète l'activité de consommation de CO mesurée dans le sol. Les travaux ont été amorcés par une mise à jour des oligonucléotides spécifiques au gène *coxL*, codant pour la grande sous unité de la CO-déhydrogénase responsable de l'oxydation du CO chez les bactéries. Ces dernières ont été utilisées pour déterminer la diversité de ce groupe fonctionnel dans le sol de trois stations d'échantillonnage adjacentes et contrastantes, soient une monoculture de maïs, une plantation de mélèzes et une forêt de feuillus. Ces essais nous ont permis de lier certaines bactéries oxydant le CO atmosphérique avec l'activité de consommation du CO mesurée. Il fut conclu que les séquences *coxL* appartenant au groupe I, particulièrement celles qui appartiennent aux δ -Protéobactéries, sont de bons indicateurs de l'activité de consommation du CO dans le sol. Cette notion fut validée lors d'une campagne d'échantillonnage indépendante. Des oligonucléotides ciblant spécifiquement les séquences *coxL* indicatrices ont été développés pour des essais de qPCR appliqués aux nouveaux échantillons de sol et ont permis de confirmer le lien qui existe entre l'abondance de ces séquences et l'activité. Les données de qPCR ont été validées en estimant l'abondance théorique des bactéries carboxydovores nécessaires pour soutenir l'activité de consommation du CO mesurée. Ces travaux sont les premiers à établir un lien étroit entre la distribution des séquences *coxL* et l'activité de consommation du CO dans le sol. La détection de l'activité chez *Halliangium ochraceum*, une δ -Protéobactérie, combinée avec la corrélation observée entre les séquences *coxL* appartenant à cet embranchement et l'activité de consommation du CO dans le sol démontre l'importance de poursuivre les travaux visant à caractériser ce groupe afin de mieux comprendre les facteurs environnementaux qui régissent le puits biologique du CO atmosphérique.



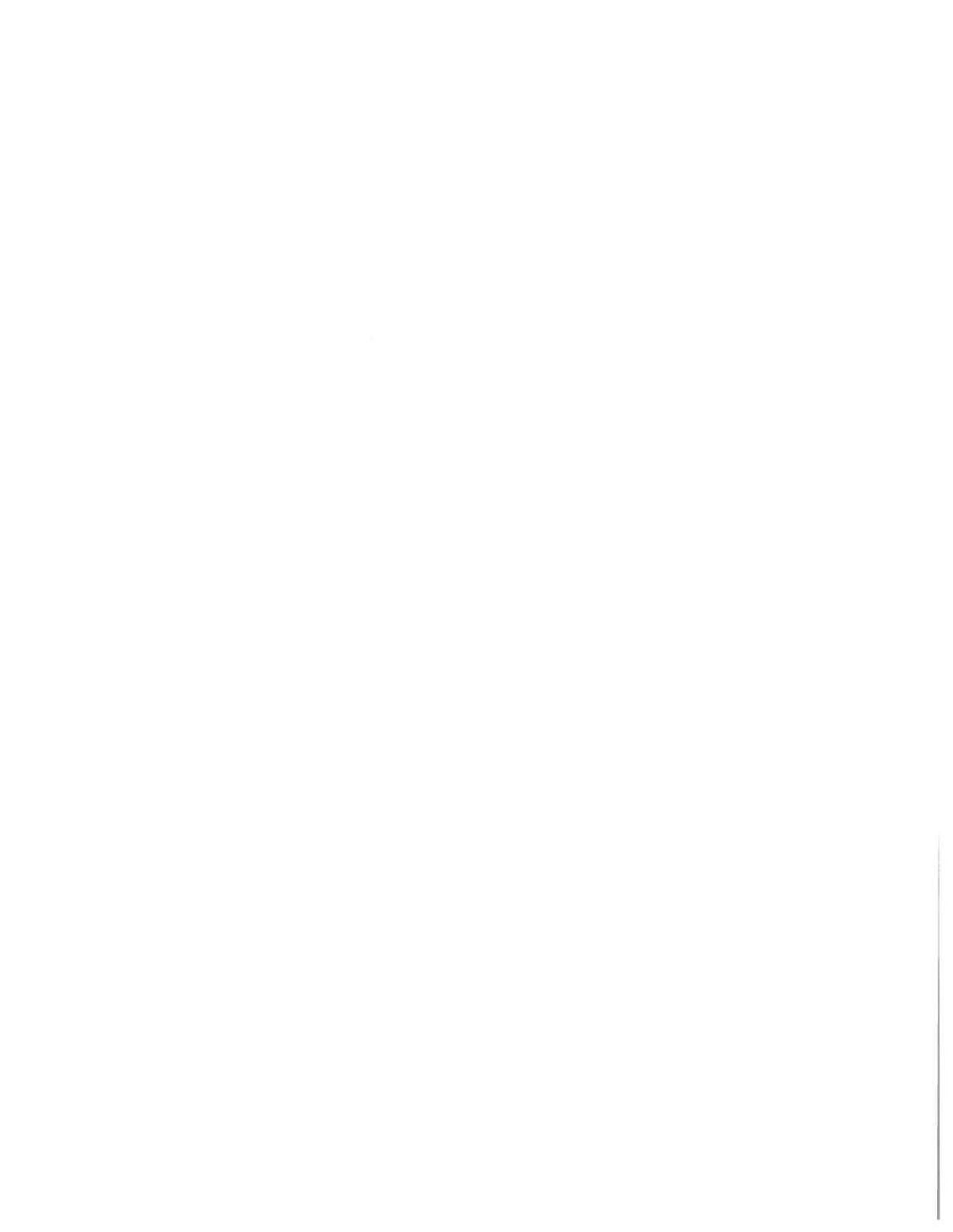
Mots-clés : Gaz trace, consommation des gaz dans le sol, atmosphère, changement global, échanges gazeux, bactéries carboxydovores



Étudiante



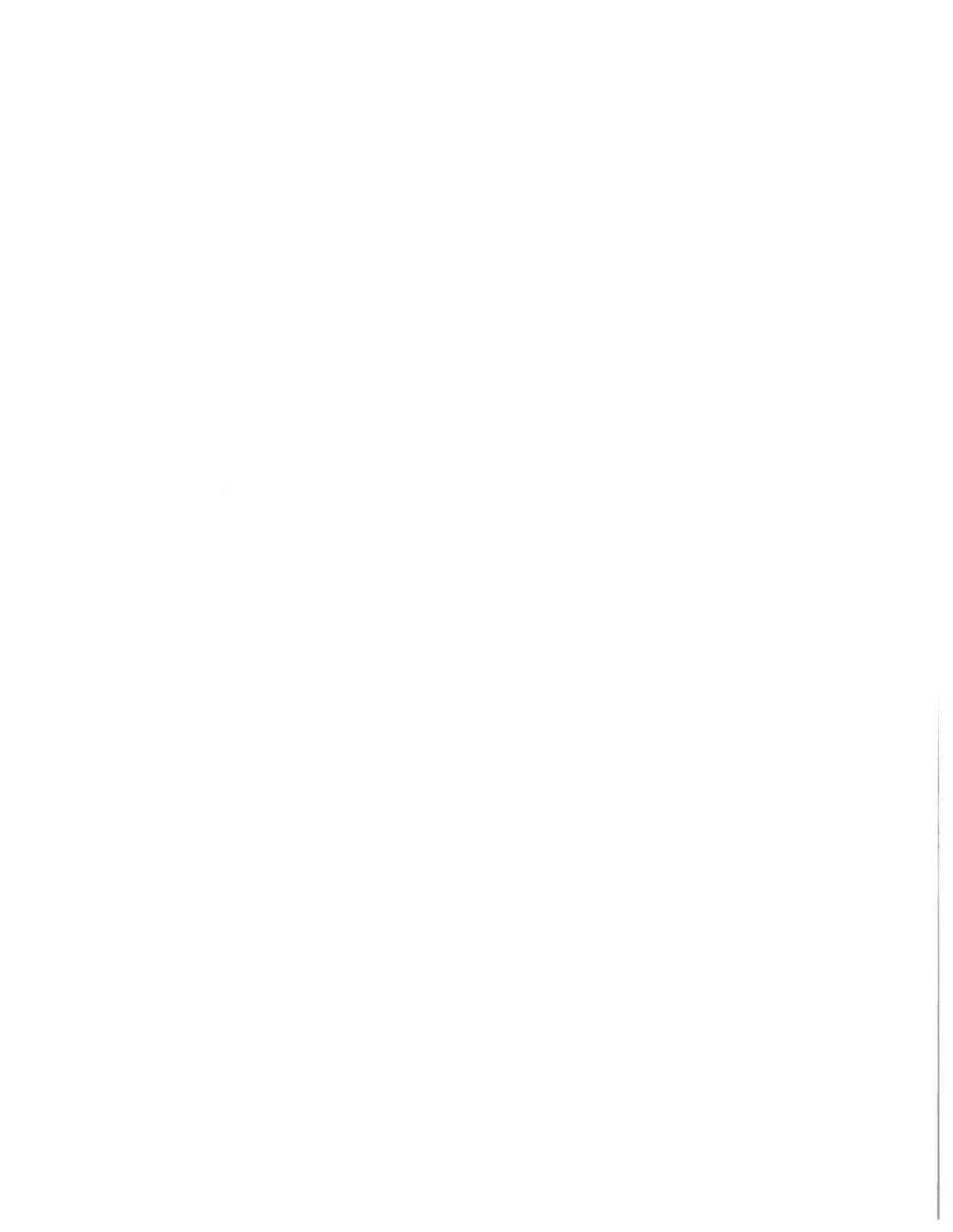
Directeur de recherche



ABSTRACT

Soil carboxydovore bacteria are responsible for atmospheric carbon monoxide (CO) sink, reducing thereby a significant portion of its anthropogenic emissions. Soils CO mitigation is a biogeochemical function of great importance, since this activity indirectly regulates the atmospheric lifetime of methane, a powerful greenhouse gas. Despite their strong implication in regulating Earth's radiative balance, very few carboxydovore bacteria have been identified so far. The objective of this study is to assess the impact of land use on soil's biological sink of atmospheric CO and identify soil carboxydovore bacteria. The hypothesis proposes that the diversity of CO oxidizing bacteria is influenced by soil physicochemical properties and reflects the activity of CO consumption measured in soil. The project began with an update of oligonucleotides targeting the gene *coxL* encoding the large subunit of CO-dehydrogenase which is responsible for CO oxidation activity in bacteria. This molecular approach allowed us to determine the diversity of this functional group in the soil of three adjacent and contrasting sampling stations which encompassed a deciduous forest, larch plantation and maize field. The tests allowed us to relate certain bacteria oxidizing atmospheric CO with soil CO uptake rates. This work led us to conclude that *coxL* sequences belonging to group I, especially those belonging to the class δ -*Proteobacteria*, are relevant indicators of CO uptake activity in soils. This concept was validated in an independent sampling campaign. Degenerate oligonucleotides targeting those *coxL* indicators sequences by qPCR were developed and applied to new soil samples. The results confirmed the relationship between the abundance of those *coxL* sequences with the CO uptake activity. qPCR data were validated by estimating the theoretical abundance of carboxydovore bacteria needed to support the CO uptake activity measured in soil. This work is the first to establish a close link between *coxL* distribution and CO uptake activity in soil. Detection of CO uptake activity in *Halliangium ochraceum*, a δ -*Proteobacteria*, combined with the observed correlation between *coxL* sequences belonging to this phylogenetic group and CO uptake activity in the soil, revealed the importance of further work to characterize this group and better understand the environmental factors that influence the biological sink of atmospheric CO.

Keywords: Trace gas, Soil Uptake, Atmosphere, Global Change, Gas exchanges, Carboxydovore



REMERCIEMENTS

Je veux rendre grâce à CELUI qui est ma source de vie, d'amour et de forteresse, qui m'a donné l'opportunité et l'énergie pour accomplir cette nouvelle étape dans ma vie, en Lui reste mon regard.

Je veux remercier de manière extraordinaire mon directeur de recherche, Philippe Constant qui m'a donné l'opportunité de participer à la belle aventure qu'est la microbiogéochimie. Jamais facile, mais toujours enrichissant, plein de statistique, mais vraiment fascinant! Merci Philippe pour ton dévouement et ta patience, pour avoir les paroles d'encouragement quand les essais ne marchent pas, pour me diriger et m'aider, ne pas seulement approfondir mes connaissances mais aussi à surpasser mes limites et à avoir plus confiance en moi. Ta présence est un grand cadeau dans ma vie.

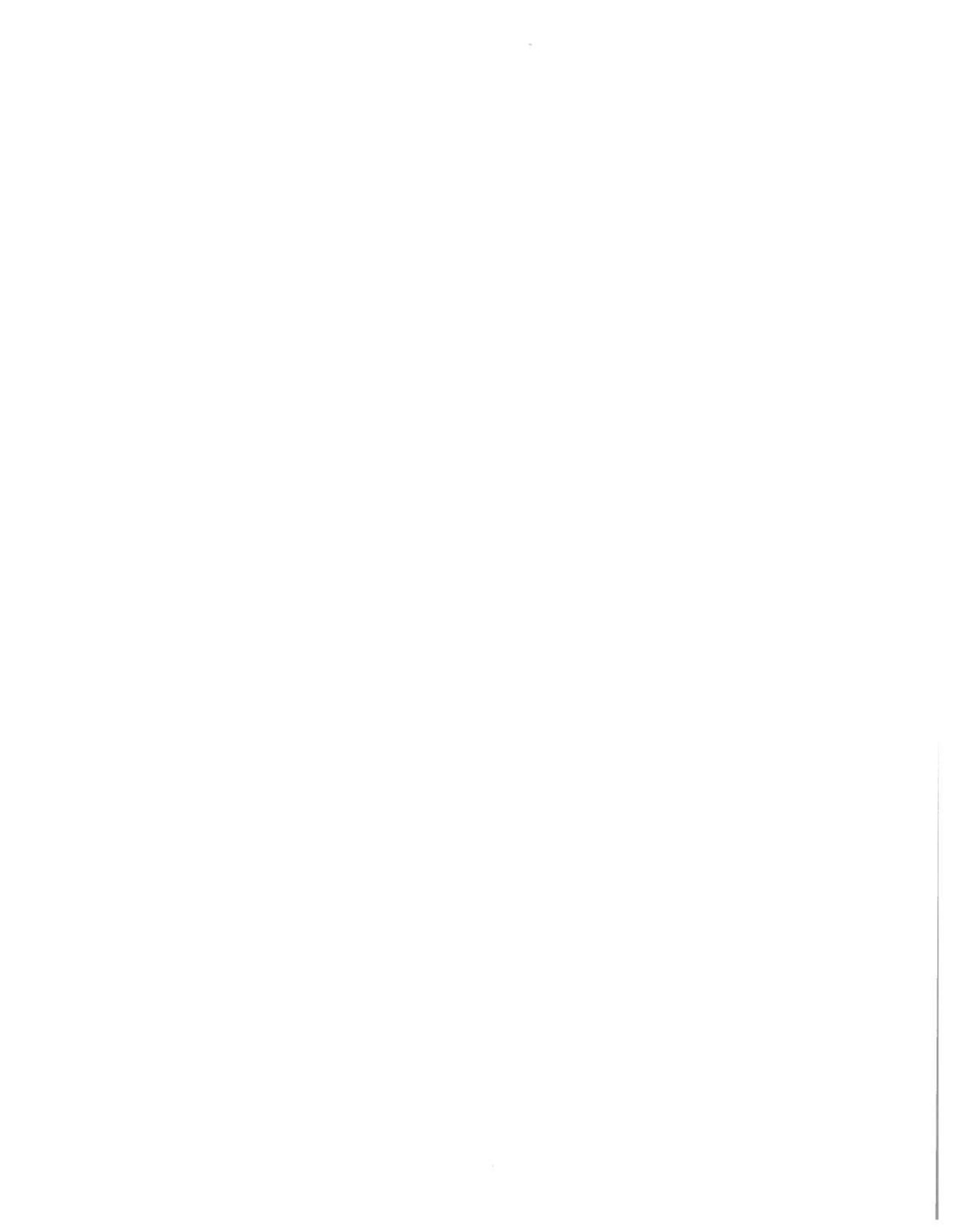
Je veux remercier Carlos Dulcey et Karla Vasquez mes deux complices au labo qui ont aidé à deux choses très importantes: à résoudre mes problèmes de la vie et du labo, et à faire de l'INRS une deuxième maison, où je voulais aller à chaque matin. Merci de votre générosité, des moments partagés, des sourires et des conseils. Je vous porte dans mon cœur, et dans mes pensées. Un grand merci à Isabelle Lalonde qui m'a accompagné pendant son stage, et m'a donné un coup de main très important pour le projet, merci aussi pour être si spéciale et allègre, merci pour les petits partages. Merci Quentin Liot, mon copain du voyage, ta folie m'a apporté de beaux sourires, « you are one of a kind » et j'ai eu la chance de te retrouver ici.

Merci à tous les amis du GRME, Christine, Arvin, Laure, Snizhana, Audrey–Anne, Narin, Jean-Philippe, Marc–André, Florian, Anastasia, Sylvain, Sarah, Mondher et tous ceux que je pourrais oublier. Merci à mes amies de la Maison St. Louis, ce n'est jamais facile de vivre à 22, mais à la fin, c'est le fun! Merci à Michel pour son inestimable aide à la bibliothèque, et pour son grand charisme, tu m'as beaucoup aidé et m'as fait rire.

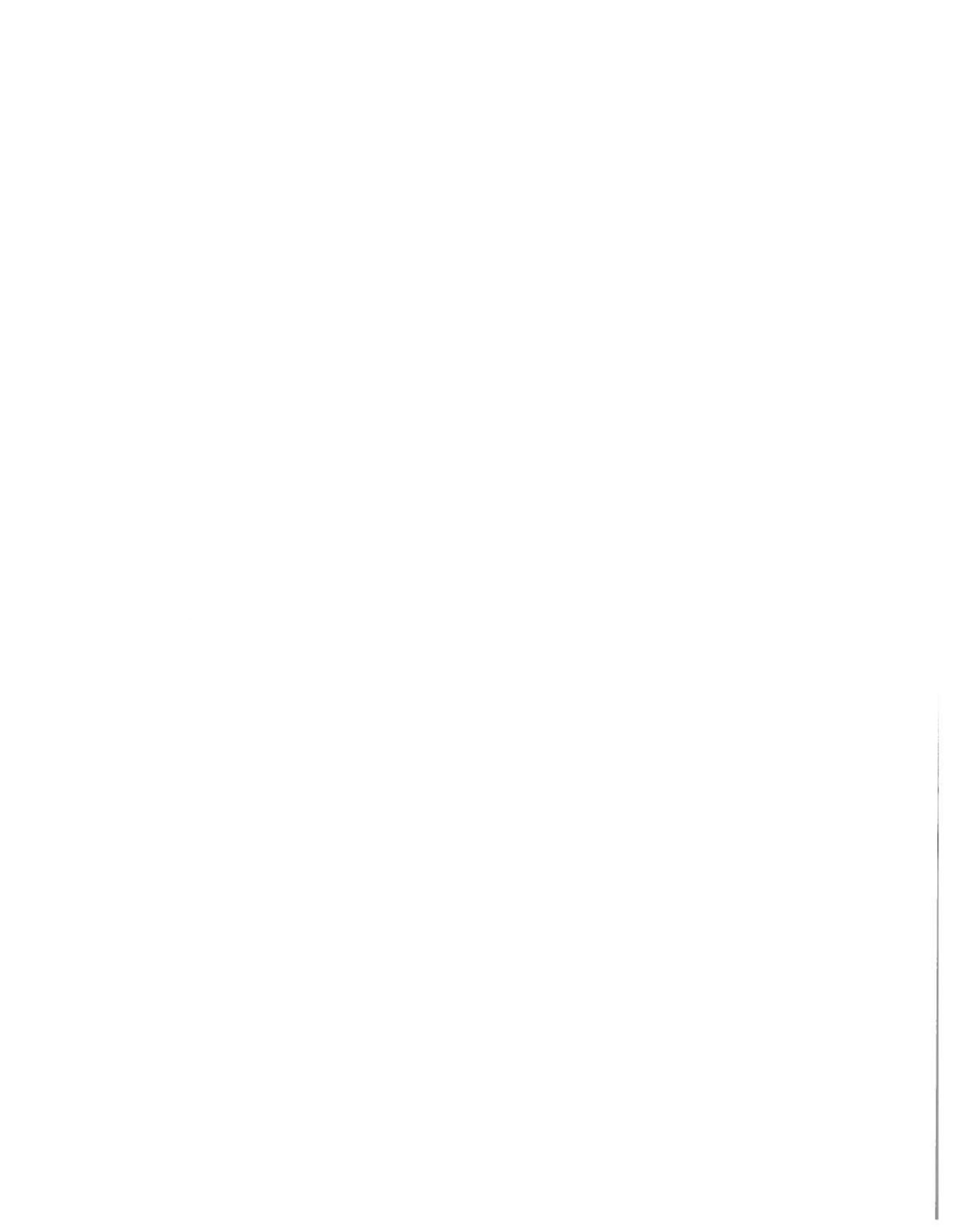
À mon père, qui m'a inspiré l'amour à travailler pour l'environnement et m'a fait penser d'aller plus loin dans mes études. Merci à ma famille pour son amour et soutien.

TABLE DES MATIÈRES

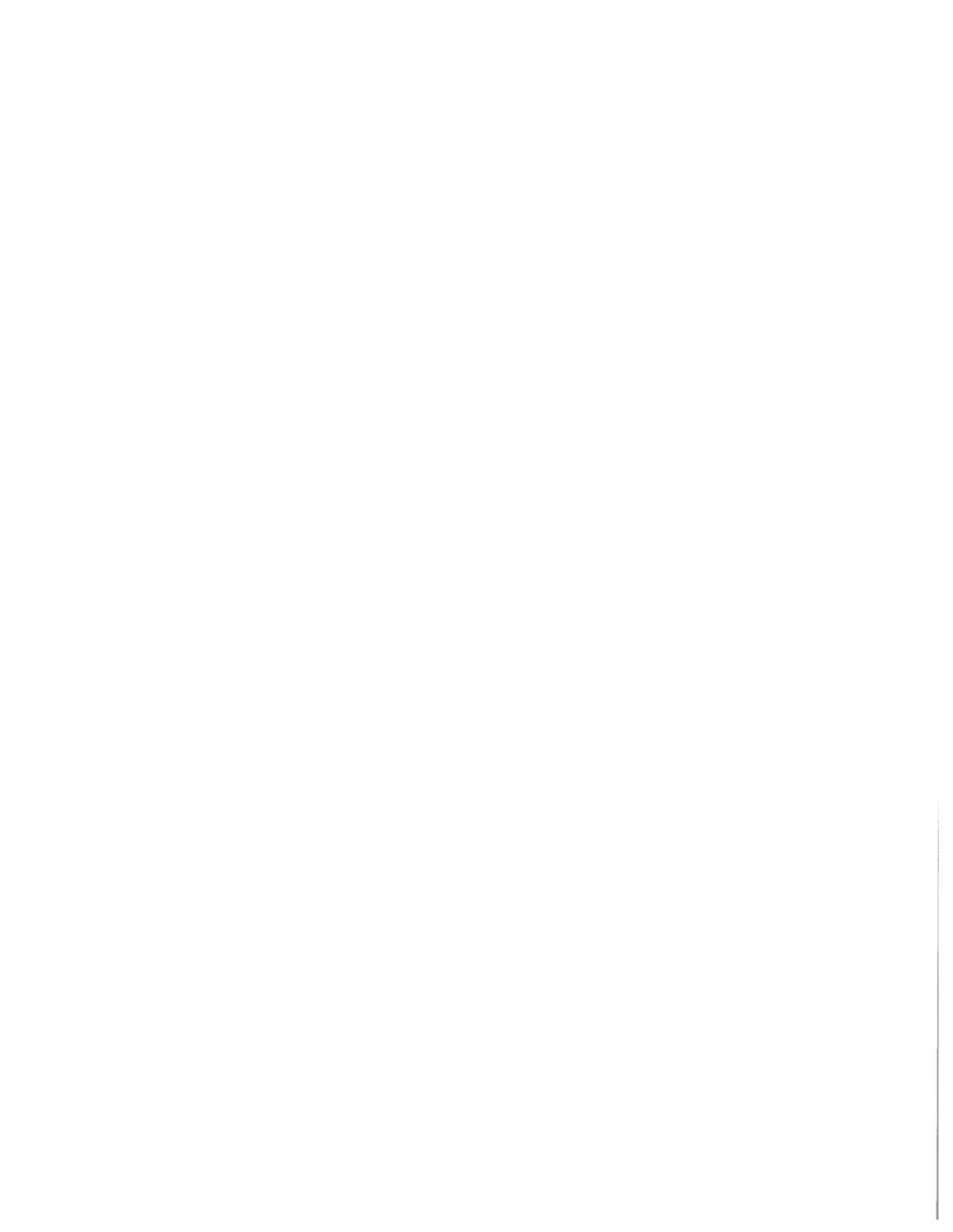
Résumé	i
Abstract.....	iii
Remerciements.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations et des sigles.....	xi
synthèse	1
Chapitre 1 : introduction	2
1.1 L'atmosphère.....	2
1.1.1 Les gaz traces et importance de l'activité anthropique sur leur bilan atmosphérique .	3
1.1.2 Microorganismes et gaz traces atmosphériques.....	5
1.1.3 L'Anthropocène – un nouveau défi dans le domaine des sciences de la Terre	7
1.2 Le Monoxyde de carbone (CO)	9
1.2.1 Abondances et concentration du CO dans l'atmosphère	11
1.2.2 Budget.....	13
1.2.3 Rôle du sol dans le bilan atmosphérique du CO	15
1.3 Bactéries oxydant le CO.....	17
1.3.1 Anaérobie vs Aérobie	18
1.3.2 La monoxyde de carbone déhydrogénase (CODH)	22
1.3.3 Carboxydovores vs Carboxydotrophes	25



2.6.3 Relationship between <i>coxL</i> gene sequences and environmental variables	55
2.6.4 Linking CO uptake activity to the abundance of <i>coxL</i> sequences and theoretical populations of carboxydovores bacteria in soil.....	57
2.7 Discussion.....	61
2.8 Acknowledgments	67
Conclusion générale et perspectives.....	68
Bibliographie	70
Annexe 1 : Matériel supplémentaire (ARTICLE).....	76
1. Supplementary Figures and Tables.....	76
1.1 Supplementary Tables.....	76
1.2 Supplementary Figure 1	83
1.3 Origin of DNA templates used as standard for the qPCR	84
1.4 Efficiency of qPCR	84
1.5 RDA: Raw data utilized for RDA analysis and statistical concepts.....	85
1.5.1 Forward selection	87
1.5.2 Hellinger transformation.....	87
1.6 UniFrac	88
1.7 Diversity measure:.....	88
1.8 Clusters explained.....	90
Annexe references	93

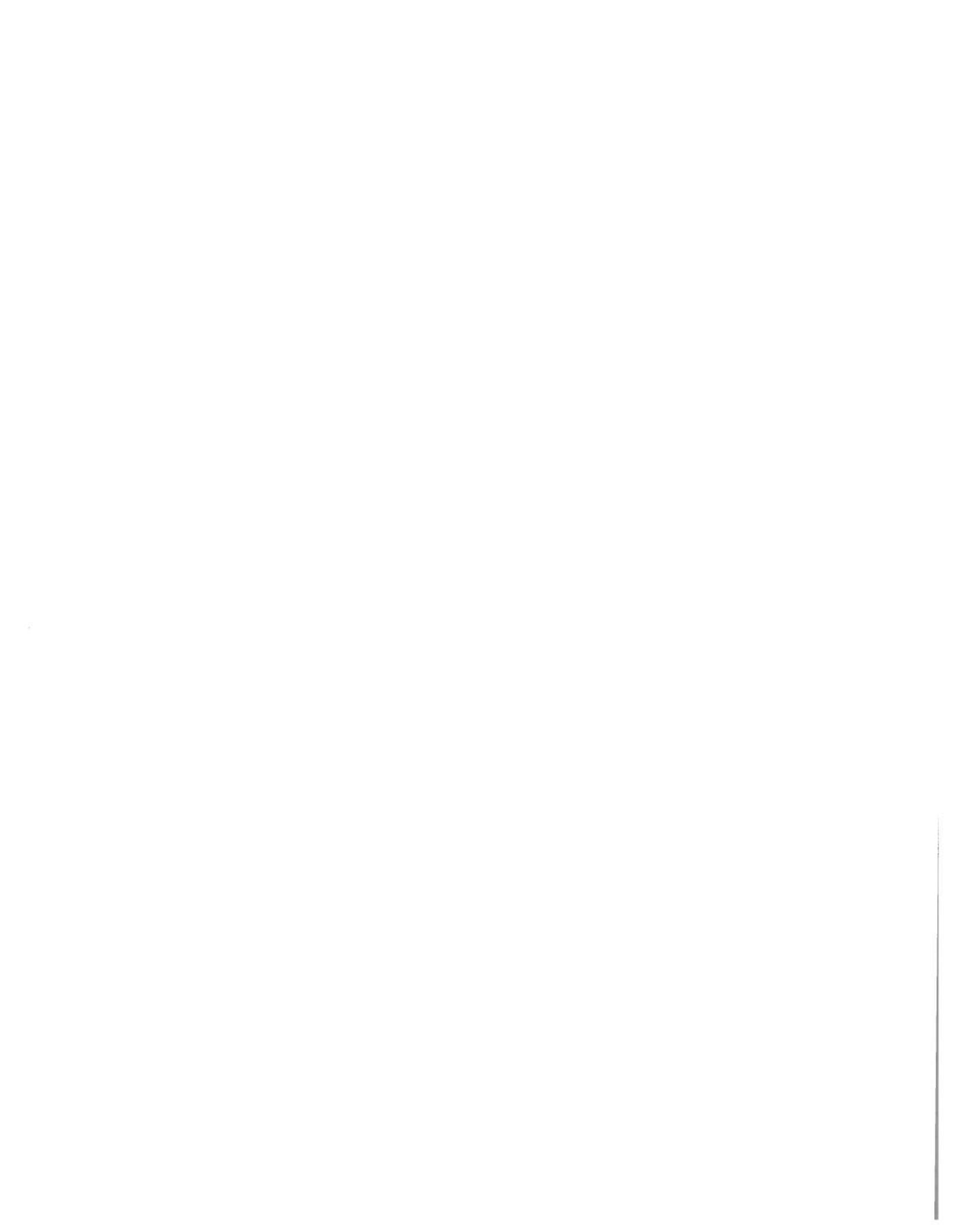


1.3.4 Affinité pour le CO	27
1.4 Quel est le destin du puits biologiques du CO	29
1.4.1 Facteurs environnementaux vs activité de consommation du CO	30
1.4.2 Impact de l'utilisation des terres sur le bilan du CO atmosphérique	31
1.5 Problématique: absence de marqueur pour l'activité dans le sol.....	32
1.6 Hypothèses	34
1.7 Objectifs	34
Article.....	35
Chapitre 2: Article.....	36
2.1 Contributions à l'article	37
2.2 Résumé.....	37
2.3 Abstract.....	38
2.4 Introduction	39
2.5 Material and Methods.....	41
2.5.1 Sites and sampling	41
2.5.2 Soil physicochemical properties.....	42
2.5.3 Microorganisms	42
2.5.4 CO uptake activity	42
2.5.6 DNA extraction and universal-coxL PCR	44
2.5.7 coxL Gene libraries.....	45
2.5.8 Type I- and <i>δ-Proteobacteria</i> -coxL qPCR assays	45
2.5.9 Statistical analysis	46
2.6 Results	47
2.6.1 Soil properties and CO uptake activity	47
2.6.2 Detection of coxL gene sequences.....	48



LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition de l'atmosphère	3
Tableau 2 : Budget du CO.....	13
Tableau 3 : Affinité pour le CO, parallèle entre l'affinité des sols de des microorganismes carboxydotrophes du sol.....	28
Tableau 4 : List of the primers designed in this study.....	44
Tableau 5 : Physicochemical properties, potential CO uptake activity and <i>coxL</i> richness in soil.....	53
Tableau S1 : List of the included sequences in the <i>coxL</i> database.....	76
Tableau S2 : Optimisation of the uni- <i>coxL</i> assay developed by King (2003) and verification of the specificity of the type I- <i>coxL</i> assay developed in this study.	83
Table S3. Raw data. Physico – chemical properties of sampled soils.....	85
Table S4. Raw data. OTU frequency table in the nine samples stations	86
Table S5. Detail of cluster <i>coxL</i> type I.....	90
Table S6. Detail of cluster <i>coxL</i> type II.....	92



LISTE DES FIGURES

Figure 1: Représentation graphique du phénomène d'effet de serre.	4
Figure 2: Variation atmosphérique de la distribution globale du CO.	12
Figure 3: Modèle d'utilisation du CO par <i>Clostridium thermoautotrophicum</i> , bactérie anaérobie oxydant le CO	19
Figure 4: Modèle d'utilisation du CO par <i>Oligotropha carboxidovorans</i> , bactérie aérobie oxydant le CO.....	21
Figure 5: Modèle de la CODH d' <i>Oligotropha carboxidovorans</i>	23
Figure 6 : Organisation de l'opéron <i>cox</i> dans différentes bactéries oxydant le CO.	25
Figure 7 : Phylogenetic analysis of <i>coxL</i> -inferred amino acid sequences by the maximum-likelihood algorithm. ...	49
Figure 8 : Correlation between the pairwise sequence identity scores of <i>coxL</i> and the 16S rRNA gene in presumptive CO-oxidizing bacteria belonging to (A) type I-CODH and (B) type II-CODH.	52
Figure 9 : UPGMA dendrogram of soil samples collected in deciduous forest (station F), maize monoculture (station A) and larch plantation (station M).....	53
Figure 10 : (A) Relative abundance of <i>coxL</i> clone sequences belonging to type I- and type II-CODH groups in the nine clone libraries. (B) Percent composition (average of three replicated clone libraries) of bacterial phyla represented by type I- <i>coxL</i> sequences detected in the three different ecosystems.	55

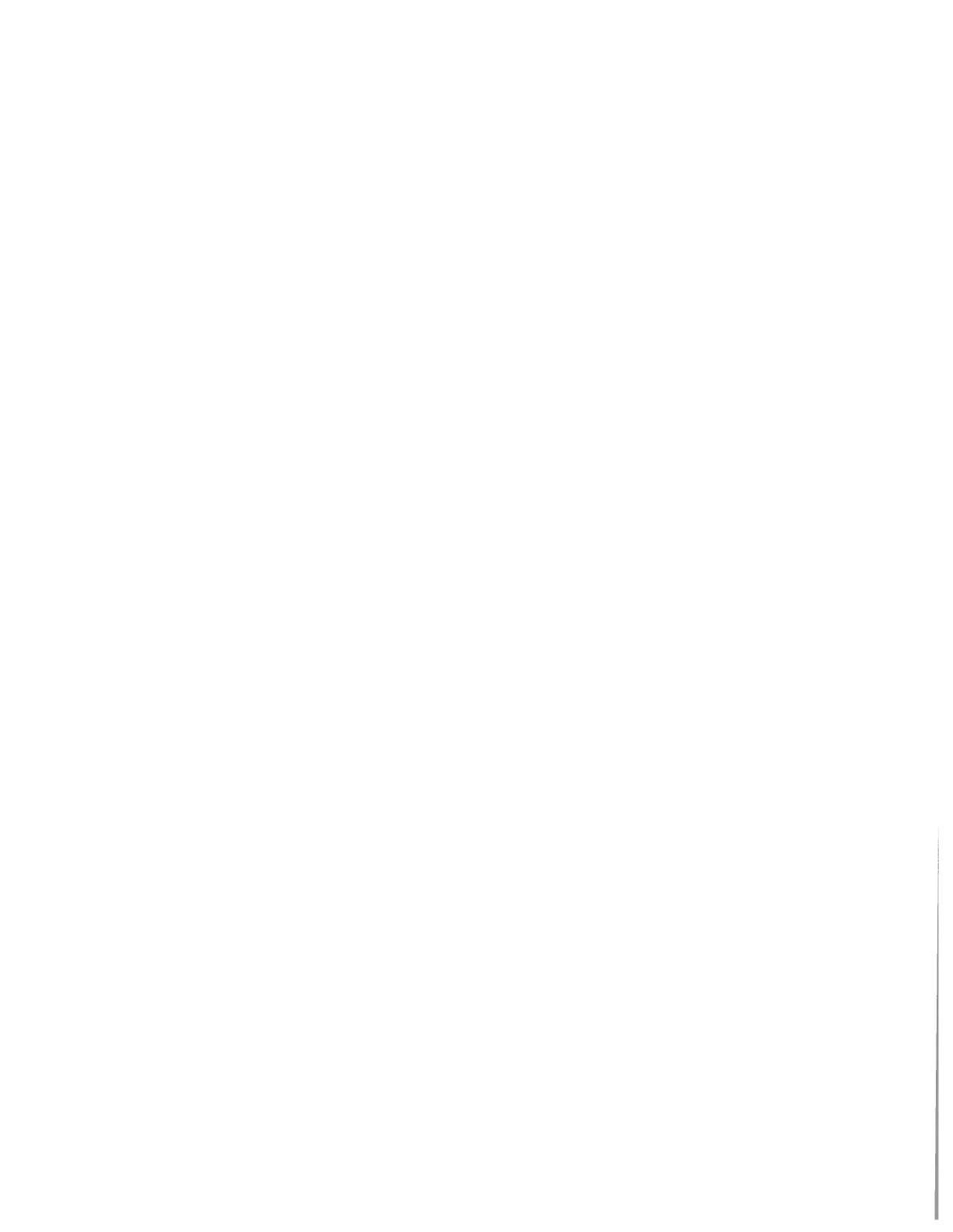
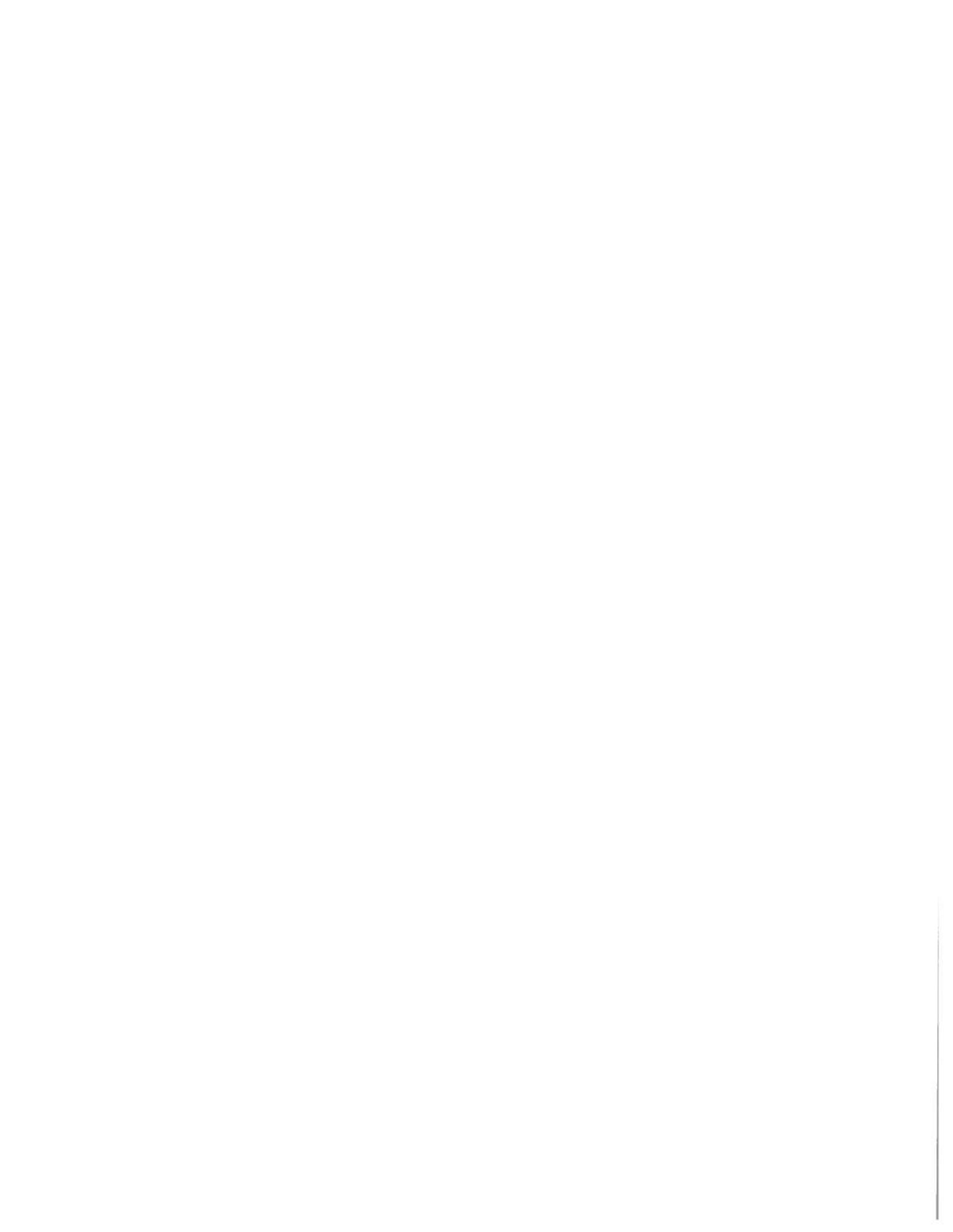


Figure 11 : Parsimonious RDA triplot of Hellinger-transformed *coxL* OTU frequency matrix explained by soil water content and CO uptake activity. 57

Figure 12 : (A) Abundance of type I-*coxL* sequences and δ -*Proteobacteria-coxL* sequences in soil.59

Figure 13 : Linear regression modelling dependence of CO uptake activity on the abundance of (A) type I-*coxL* and (B) δ -*Proteobacteria-coxL* copy number in soil assessed by qPCR. 60

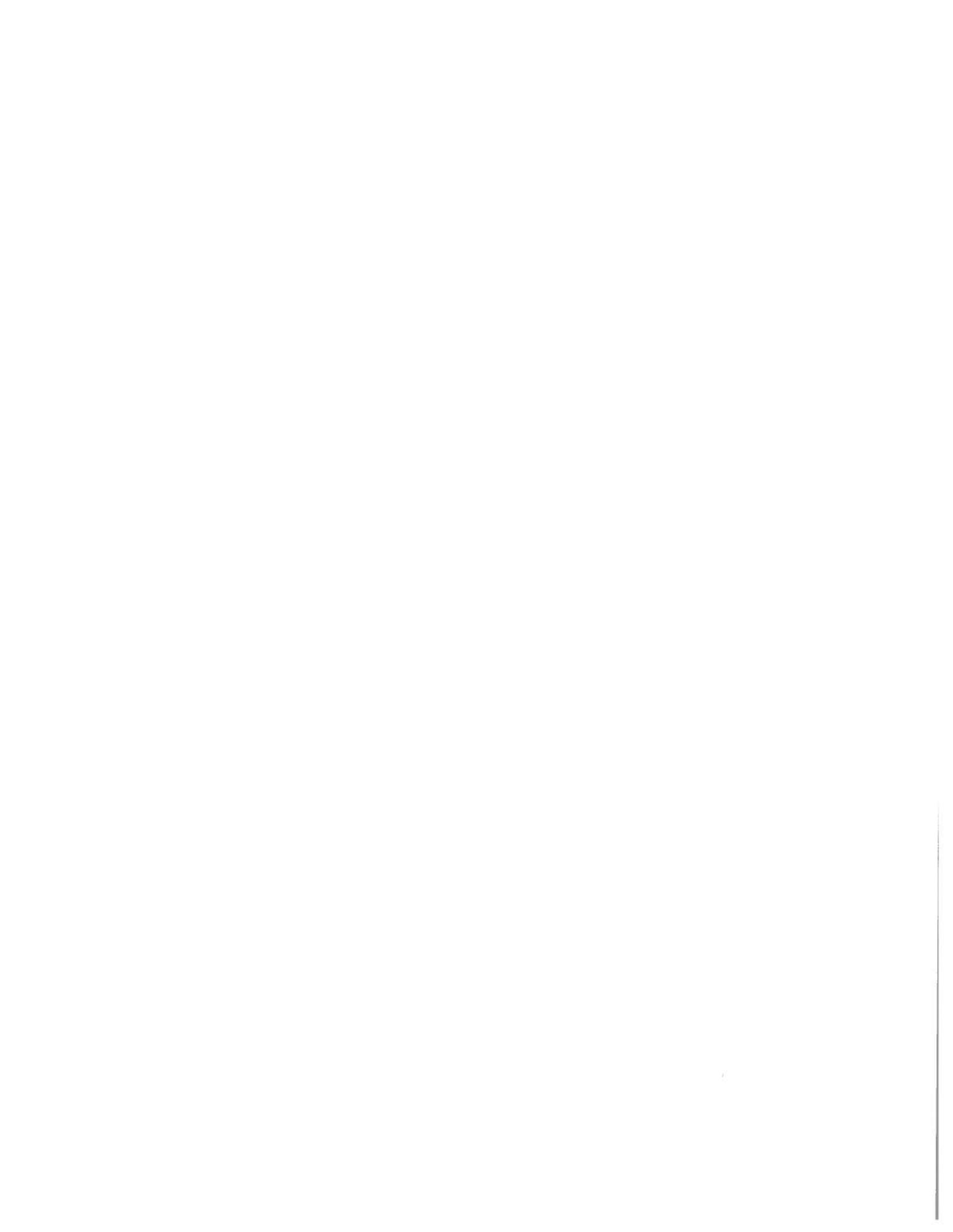
Figure S1: Representative CO oxidation activity in *H. ochraceum*.....84



LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES

ACS	Acétyle CoA synthétase
CBB	Cycle de Calvin-Benson-Bassham
CFCs	Chlorofluorocarbures
CH ₄	Méthane
CODH	<i>Carbon Monoxide Dehydrogenase</i>
CO	Monoxyde de carbone
CO ₂	Dioxyde de carbone
CTM	Modèle de transport chimique (<i>Chemical Transport Model</i>)
DMS	Diméthylsulfate
GIEC	Groupe d'experts intergouvernementaux sur l'évolution du climat
HCFs	Hydrofluorocarbonés
HCl	Acide chlorhydrique
HO ₂	Hydroperoxyde
hPa	Hecto Pascals : unité de la pression atmosphérique
H ₂ S	Sulfure d'hydrogène
<i>hν</i>	Réaction photochimique (réaction exécutée en présence de rayons UV)
<i>K_m</i>	Constante d'affinité pour un substrat
N ₂	Azote
NH ₃	Ammoniac
NMHC	Hydrocarbures sans méthane (<i>Nonmethane hydrocarbons</i>)
NO _x	Terme générique pour désigner l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO ₂)

<i>M</i>	Molécule d'air
O ₂	Oxygène
OCS	Oxysulfure de carbone
PLFA	<i>Phospholipid Fatty Acids</i>
PRG	Potentiel de réchauffement global
SO ₂	Dioxyde de soufre



SYNTHÈSE

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 L'atmosphère

L'atmosphère est la couche de gaz qui entoure la Terre, de sa surface jusqu'à 1000 km d'altitude et qui est retenue par la gravité. C'est un mélange d'une grande quantité de constituants chimiques. Même si l'atmosphère ne représente qu'une partie infime de la masse de la planète, elle détermine les conditions de vie à sa surface. La composition de l'atmosphère de la Terre a changé drastiquement entre la période pré-biotique et la période contemporaine. Pendant la formation de la planète, les corps en collision qui ont formé la Terre possédaient divers gaz à base d'hydrogène et de l'eau sous forme de glace, éléments qui ont été perdus dans l'espace par l'action de la radiation solaire, ce qui faisait en sorte que la terre primitive était dépourvue d'une atmosphère.

Dans une autre phase de la formation de la planète, il y a environ 4,5 milliards d'années, les grandes quantités de volcans qui existaient expulsaient beaucoup de gaz qui, par conséquence, ont formé la première atmosphère. Cette atmosphère primitive contenait principalement du dioxyde de carbone (CO_2), du monoxyde de carbone (CO), de l'hydrogène (H_2), du méthane (CH_4), de l'ammoniac (NH_3), du sulfure d'hydrogène (H_2S), du dioxyde de soufre (SO_2), de l'acide chlorhydrique (HCl) et de la vapeur d'eau. C'est sous cette atmosphère très réductrice que s'est produite l'apparition des premières formes de vie sur Terre, où des microorganismes simples capables d'utiliser les éléments de l'atmosphère pour leur croissance et leur survie sont apparus. La formation des océans et le refroidissement de la planète ont favorisé l'émergence des premiers organismes vivants capables de survivre par photosynthèse. À cette époque, l'oxygène moléculaire atmosphérique (O_2), alors à l'état de trace, était formé par la photolyse de la vapeur d'eau en haute atmosphère, suivie par la perte des atomes d'hydrogène dans l'espace. La concentration d' O_2 demeurait basse en raison de sa capture par le fer dissous dans les océans, mais l'arrivée des cyanobactéries, capables de capter l'ammonium et le CO_2 dissous dans l'eau, a conduit en une forte production d' O_2 issue de la photosynthèse, il y a environ 2,4 milliards d'années. Une fois que l' O_2 a été produit et accumulé dans l'atmosphère, les rayonnements ultraviolets fractionnaient ces molécules résultant en la formation de la couche d'ozone (O_3). La formation de la couche d' O_3 procurait alors à la Terre une protection contre le rayonnement ultraviolet, ce qui aurait permis la colonisation du sol

terrestre et la composition actuelle de l'atmosphère (Brasseur *et al.*, 1999). Le tableau 1 montre la composition de l'atmosphère contemporaine en incluant ses gaz à faible concentration: les gaz traces.

Tableau 1. Composition de l'atmosphère (Brasseur *et al.*, 1999).

Élément	Concentration
Azote (N ₂)	78%
Oxygène (O ₂)	21%
Vapeur d'eau	0,001 – 5%
Gaz traces	
Argon (Ar)	0,9%
CO ₂	360 ppmv
Ne	18 ppmv
He	5 ppmv
CH ₄	1,8 ppmv
H ₂	0,5 ppmv
NO ₂	0,3 ppmv
CO	50 – 200 ppbv
O ₃	0,5 – 500 ppbv
NMHC	5 – 20 ppbv
Halocarbones (<i>i.e.</i> Chlore)	3,8 ppbv

1.1.1 Les gaz traces et importance de l'activité anthropique sur leur bilan atmosphérique

Les gaz plus abondants dans l'atmosphère sont la vapeur d'eau, l'O₂ et l'azote (N₂). Néanmoins, les gaz traces sont très importants malgré leurs faibles concentrations dans l'atmosphère (<1%) en raison de leur forte réactivité. L'oxyde d'azote (NO), le CH₄, le NH₃ et un certain nombre d'autres constituants traces de l'atmosphère terrestre ont des bandes absorption infrarouges dans un large spectre et contribuent au phénomène d'effet de serre, c'est à dire, la chaleur, sous forme de rayonnement infrarouges qui serait normalement dissipée dans l'espace,

est absorbée par les constituants atmosphériques (tels que H₂O, CO₂, CH₄ et autres) conduisant à chauffer l'atmosphère terrestre. Lorsque la concentration atmosphérique de ces gaz augmente en raison de l'activité anthropique, ce phénomène a le potentiel de modifier le climat sur Terre (Brasseur *et al.*, 1999).

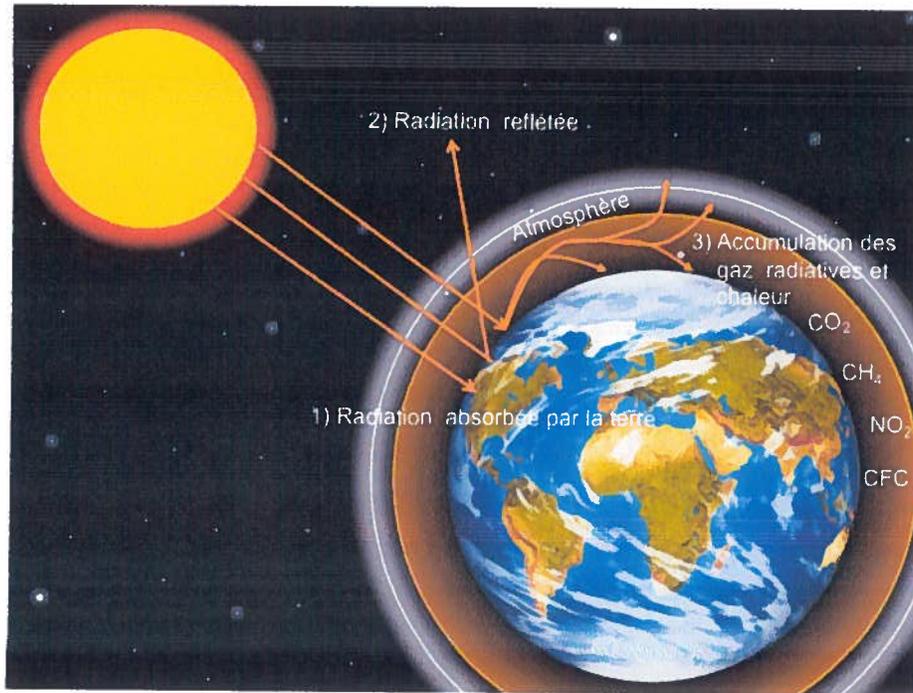


Figure 1. Représentation graphique du phénomène d'effet de serre.

La vapeur d'eau, le CO₂, le CH₄, le dioxyde d'azote (NO₂), l'O₃ et les aérosols influencent la transmission de la radiation solaire et terrestre dans l'atmosphère. Ils sont liés avec le système climatique physique, ils déterminent la capacité d'oxydation de l'atmosphère et ils sont des composantes importantes dans les cycles biogéochimiques. Des activités humaines comme la stimulation de l'agriculture par fertilisation chimique, la combustion des carburants, l'utilisation des réfrigérants halogènes, etc. sont responsables de perturbations significatives dans la distribution et l'abondance de ces gaz. Ces altérations sont susceptibles d'affecter le système climatique dont l'intensité peut, en principe, être quantifiée en calculant la variation de la température de la surface induite par ces gaz. Toutefois, cette quantification dépend en grande partie de processus de rétroaction complexes qui ne sont pas totalement compris, ni facilement représentés dans les modèles climatiques actuels.

Pour évaluer l'impact des perturbations dans l'atmosphère sur le climat, la méthode la plus réaliste à effectuer est le calcul du bilan radiatif terrestre, lequel est défini comme la réponse dans les flux d'énergie radiatifs nets suite à des changements dans la concentration

d'un gaz trace spécifique. Plusieurs facteurs déterminent la capacité d'un gaz atmosphérique à affecter le bilan radiatif : sa concentration atmosphérique (sous le contrôle direct de ses sources et de ses puits), la force et la position spectrale de sa bande d'absorption infrarouge, la température et la pression (Brasseur *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 1976). Il est donc fondamental de surveiller l'abondance des gaz traces avec précision pour déterminer les tendances réelles de leurs concentrations et ainsi être en mesure de prévoir les conséquences climatiques de l'évolution atmosphérique accélérée que l'humanité induit sur Terre, notamment :

- Le réchauffement climatique dû aux gaz à effet de serre, l'augmentation dans l'abondance du CO₂, CH₄ et le N₂O, (Daniel *et al.*, 1998, GIEC, 2001, Wang *et al.*, 1976)
- La destruction de la couche d'O₃ stratosphérique due à l'abondance accrue des composés halogénés et du N₂O (GIEC, 2001).
- Une augmentation de la quantité d'O₃ troposphérique en raison de l'augmentation des émissions de NO_x, de CO et d'hydrocarbures (Chin *et al.*, 1994, GIEC, 2001, Holloway *et al.*, 2000).
- Les changements dans la densité des nuages dans la troposphère et des aérosols dans la stratosphère dus à l'altération des émissions de sulfate de diméthyle (DMS) et oxysulfure de carbone (OCS), respectivement (GIEC, 2014).

1.1.2 Microorganismes et gaz traces atmosphériques

En plus du rôle de l'activité anthropique mentionnée précédemment, les microorganismes exercent un rôle central sur la composition de l'atmosphère terrestre. L'exemple le plus marquant de la force des microorganismes est sans contredit la transition d'une atmosphère primitive très réductrice à une atmosphère oxydative capable de soutenir des organismes vivants plus complexes. Les microorganismes participent au métabolisme et à la recirculation de quasiment tous les gaz atmosphériques sauf quelques gaz rares. L'O₂, le CH₄, le CO₂ et le NH₃ sont des exemples de produits qui proviennent de sources biologiques et qui, en se libérant dans le système terrestre, mettent en évidence l'importance des microorganismes au maintien de la vie sur Terre. Ces fonctions biologiques résultant en la production ou la consommation des gaz traces est en grande partie assumée par les microorganismes qui se trouvent distribués dans tous les compartiments de la biosphère, mais en grande partie dans les sols (Brasseur *et al.*, 1999, Conrad, 1996).

Le terme "microorganismes" peut être ambiguë, se référant souvent à différents groupes taxonomiques. Dans le cas de l'évolution de la constitution de l'atmosphère terrestre, ce terme

se réfère aux membres faisant partie des bactéries, des archées, et les diverses formes d'eucaryotes, comprenant les protozoaires, les levures, les champignons et les algues microscopiques (algues vertes), et les animaux tels que les rotifères et planaires. Tous ces microorganismes sont essentiels pour le recyclage des nutriments dans la biosphère, car ils agissent comme des décomposeurs ou des producteurs primaires. Les microorganismes ont profité des gaz traces comme source d'énergie au cours de leur évolution. Ils ont développé des mécanismes enzymatiques capables de les utiliser comme substrats de croissance, co-métabolites et comme produits stœchiométriques.

Le métabolisme microbien est une des variables qui contrôlent les échanges de gaz traces entre les différents habitats (sols et milieux aquatiques) et l'atmosphère. Ces processus métaboliques sont affectés par les variables environnementales (par exemple, la température et la disponibilité des nutriments) agissant soit sur les vitesses de réactions enzymatiques catalysées par les populations microbiennes résidentes, sur l'activation de nouvelles activités enzymatiques, ou sur la prolifération de certains microorganismes du sol. Tous ces niveaux de contrôle sont importants, car c'est de cette manière que la structure des communautés microbiennes affecte la dynamique des gaz traces dans les écosystèmes terrestres.

Pour corréler la fonction des divers habitats avec leurs populations microbiennes, il est important de connaître l'identité des groupes physiologiques impliqués, leur abondance et leur distribution dans l'environnement. Toutefois, le rôle de la composition des communautés microbiennes n'est pas bien compris à cause de la complexité des interactions qui existent entre les différents représentants. Il y a cependant des activités biogéochimiques spécifiques reliées à des populations fonctionnelles bien définies (e.g. archaea méthanogènes, bactéries oxydant le H₂, bactéries dénitrifiantes et bactéries oxydant le CO) (Schimel *et al.*, 1998). Il est important d'étudier la structure des communautés microbiennes capables de métaboliser les gaz traces, car ils modulent la dynamique de ces gaz dans chaque écosystème et à l'échelle globale.

Dans ce contexte, on utilise l'expression «*changement global*» qui désigne les altérations biophysiques et socioéconomiques qui transforment la structure et le fonctionnement du système terrestre. Elles se traduisent, à titre d'exemples, par l'utilisation des terres, la pollution et la fertilisation. Le changement global est sous l'influence de la croissance de la population humaine, de ses besoins en termes de ressources et de ses activités. L'exploitation des ressources naturelles pour répondre aux besoins grandissants de l'humanité transforme la surface de la planète par l'urbanisation, les cultures agricoles et forestières, la déforestation et l'érosion. Ensemble, ces pressions induisent soit directement ou indirectement des

changements au niveau des réactions biologiques et abiotiques impliquées dans les cycles biogéochimiques. L'influence sur les processus biogéochimiques découle d'une pression sur le fonctionnement des organismes (plantes, animaux et microorganismes) ou par la restructuration des communautés en modifiant leur distribution et leur physiologie (Schimel *et al.*, 1998). Il est donc important de suivre et prédire la réponse des communautés microbiennes aux altérations globales afin d'assurer la survie de l'humanité soumise à ces changements globaux.

1.1.3 L'Anthropocène – un nouveau défi dans le domaine des sciences de la Terre

Étant donné l'importance des effets anthropiques sur l'atmosphère et l'importance de prédire le destin des écosystèmes qui aident à moduler le bilan radiatif terrestre, il faut être conscient de la problématique environnementale globale actuelle qui marque le passage de la planète à une nouvelle période géologique : l'Anthropocène. Par définition, l'Anthropocène est une nouvelle ère géologique définie par la modification de la nature en raison de l'action de l'Être humain et de la société. L'humanité est arrivée au point de générer des altérations dans les écosystèmes à une échelle si grande, qui la rend une force géophysique considérable (par exemple, au point de changer le climat global). Selon les géologues, la planète est passée de l'époque géologique Holocène à cette nouvelle ère dominée par l'homme, « l'Anthropocène ».

Steffen *et al.*, (2007) ont établis trois étapes principales à l'Anthropocène. Il y a premièrement l'étape de transition de la période préindustrielle à industrielle (1800 – 1945). À cette époque, il y a eu une croissance dans l'utilisation des combustibles fossiles comme le charbon, le pétrole et le gaz naturel. C'était le début de la production de l'énergie et de l'eau par flux continu comme les moulins à vent et les barrages, ainsi que le stockage et l'élevage des animaux à grande échelle, des cultures, l'invention des nouvelles technologies et la synthèse des fertilisants chimiques à base d'azote. Tous ces progrès ont amélioré la qualité de vie dans les pays industrialisés, ce qui a fait augmenter la population ainsi que les «changements à échelle globale». La deuxième étape est caractérisée par une accélération du changement global après la deuxième guerre mondiale (1945 – 2015). L'accessibilité à des véhicules moteur pour le transport et le travail a mené la croissance dans l'utilisation des dérivés du pétrole. La population dans les centres urbains a augmenté de 30 à 50%, des programmes de salubrité ont été établis par les organismes de santé publique et des villages croissent pour devenir des villes. Les concentrations atmosphériques de gaz à effet serre ont augmenté considérablement, et cela fait en sorte que la Terre a tendance à se réchauffer rapidement. La pression sur l'environnement est devenue intense, les changements dans les écosystèmes sont devenus

rapides et des extinctions au niveau des écosystèmes terrestres et aquatiques ont eu lieu en réponse directe avec l'activité anthropique. L'étape finale proposée par Steffen et al. (2007) n'a pas encore été déclenchée. Elle encadre une prise de conscience et la mitigation des impacts de l'activité humaine. L'accélération des changements anthropiques atteint un point critique, ce qui représente un grand défi pour les prochaines décennies. La voie d'atténuation pour décharger les systèmes terrestres de la pression humaine vise à utiliser différentes nouvelles technologies et améliorer la gestion des écosystèmes par l'utilisation rationnelle des ressources naturelles, le contrôle de la population humaine et des animaux domestiques, l'utilisation globale prudente de l'environnement, et sa restauration. Le but ultime de cette époque contemporaine est de réduire les altérations humaines introduites dans les écosystèmes à l'échelle mondiale pour éviter des niveaux et taux de variation dangereux ou difficiles de mitiger, et finalement, pour permettre au système terrestre de fonctionner à nouveau selon le mode pré-Anthropocène (Steffen *et al.*, 2007, Vitousek *et al.*, 1997).

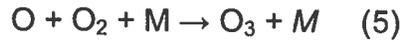
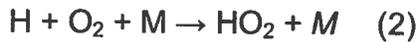
Ce raisonnement est le point de départ pour le développement de recherches comme celle qui est décrite dans ce mémoire. Il faut réunir tous les efforts possibles pour accepter le défi auquel nous faisons face et proposer des méthodes et technologies qui pourront ramener la planète à l'équilibre. L'objectif ultime est de protéger les cycles biogéochimiques tout en poursuivant notre développement. Il est urgent d'agir puisque les conséquences des activités humaines sont déjà perceptibles. À l'époque actuelle, les proportions, échelles et combinaisons d'altérations environnementales sont démesurées, ayant atteint un seuil incomparable à ce qui a été observé dans tous les temps. Les travaux présentés dans ce mémoire portent principalement sur le CO₂, dont la dynamique est directement sous l'influence des microorganismes et de l'activité anthropique.

1.2 Le Monoxyde de carbone (CO)

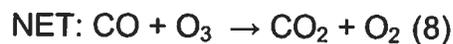
Depuis les premiers stades du développement de la Terre, le CO a été un élément clé de l'atmosphère. Sa participation à la formation et à l'évolution de la biosphère font en sorte que le CO est toujours impliqué dans divers processus biotiques et abiotiques qui ont lieu dans la biosphère. Cela donne actuellement au CO une contribution modeste mais significative dans presque tous les aspects de la chimie atmosphérique et de la vie sur la planète. Il est surprenant que, bien que toxique pour les êtres vivants, le CO participe à plusieurs activités biologiques quand il se trouve dans une dose appropriée (Davidge *et al.*, 2009).

Après le CH₄, le CO est la molécule réduite ayant la plus longue durée de vie dans l'atmosphère, laquelle peut s'étendre sur une période de 0,4 à 2 mois (Daniel *et al.*, 1998). Le CO est caractérisé par une faible absorption des rayonnements infrarouges terrestre. Il n'est donc pas un gaz à effet de serre direct, mais contribue à déterminer la «capacité d'oxydation» de l'atmosphère. Le CO contrôle effectivement la distribution des radicaux hydroxyles (OH·), la principale molécule ménage responsable de l'élimination d'un grand nombre de gaz traces réducteurs dans la troposphère. La réaction entre le CO et les OH· représente 85% des pertes globales du CO émis à l'échelle planétaire. Par cette réactivité avec les OH·, le CO affecte indirectement la chimie de la couche d'O₃ (Holloway *et al.*, 2000) et la durée de vie des gaz traces biogéniques et anthropiques tels que le CH₄, l'H₂, le NO et les composés fluorocarbonés (CFCs). L'augmentation des concentrations du CO atmosphérique peut donc mener à la baisse des concentrations des OH· disponibles pour la destruction de certains gaz à effet de serre, déterminant ainsi la composition chimique et des propriétés radiatives de l'atmosphère (Novelli *et al.*, 1998). On attribue donc au CO le titre de « gaz à effet de serre indirect » comportant un potentiel de réchauffement global (PRG) réel, ce qui fait sorte qu'il s'agisse d'un des gaz traces les plus remarquables de l'atmosphère.

Tel que discuté auparavant, l'O₃ joue une partie intégrale dans la chimie atmosphérique et le CO peut participer soit à sa production ou à sa destruction. Dans des régions avec suffisamment de NO_x (régions urbaines polluées avec NO_x > 1ppb), le HO₂ produit suite à l'oxydation du CO par les OH· (réactions 1 et 2) peut déclencher des réactions photochimiques qui mènent à la formation nette d'O₃, la composante principale du smog qui cause des problèmes de santé publique considérables (réactions 3 à 5). La photolyse du NO₂ et la réaction subséquente de ses sous-produits avec l'O₂ est d'ailleurs la seule voie connue pour produire l'O₃ dans la troposphère (Brasseur *et al.*, 1999).



Évidemment, l'augmentation des concentrations d'O₃ dépend des conditions de pollution atmosphériques locales. Par exemple, dans des régions rurales non-polluées où les niveaux de NO_x sont bas (<30 pptv), la réaction directe de l'HO₂ avec l'O₃ cause sa destruction, comme le montre la réaction suivante (Blanchet *et al.*, 2008, Brasseur *et al.*, 1999, Chin *et al.*, 1994, Daniel *et al.*, 1998, Holloway *et al.*, 2000):

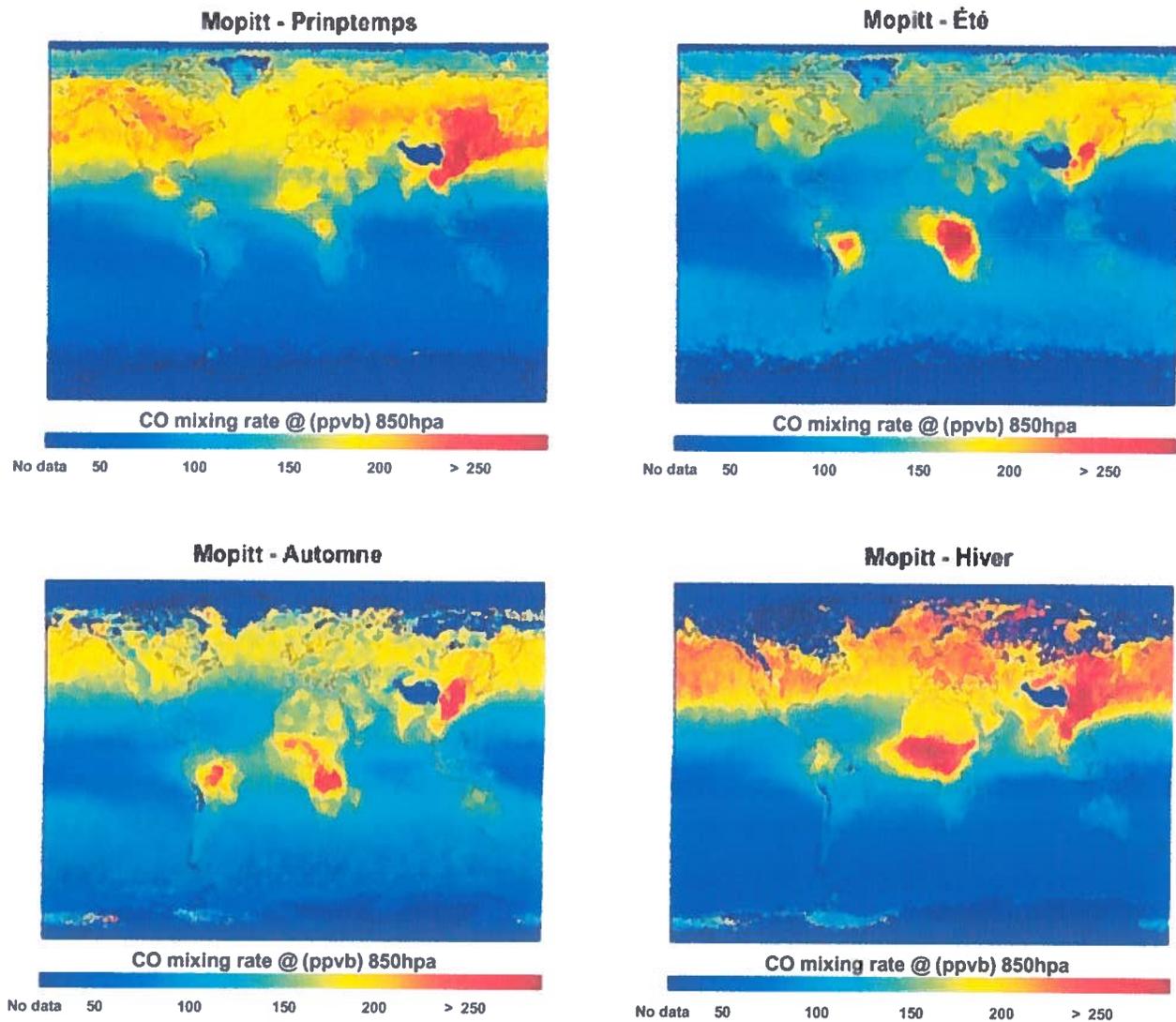


Certaines études démontrent que les émissions de CO exercent des pressions considérables au bilan radiatif terrestre, comparables ou même plus fortes que certains gaz à effet de serre. Par ailleurs, des études basées sur la combinaison de modèles de «boîtes photochimiques» et des études globales basées sur des modèles de transport chimique multidimensionnels suggèrent que le fait d'émettre 100 Tg de CO est équivalent à l'émission de 5 Tg de CH₄ puisque les quantité de CO libérée causent des perturbation dans le cycle du CH₄ (augmentation de sa durée de vie dans l'atmosphère en raison d'une diminution de la disponibilité des OH·) et le CO émis a le potentiel de persister pour une période allant de quelques mois jusqu'à 12 ans (Daniel *et al.*, 1998, GIEC, 2001). L'impact et l'intensité de ses perturbations varient en fonction de l'abondance des émissions du CO dans différents endroits (e.g. hémisphère nord ou hémisphère sud) et les conditions atmosphériques locales. Le

potentiel PRG du CO peut être sous-estimé si on ne tient pas compte de ces paramètres (Daniel *et al.*, 1998, GIEC, 2001) qui montrent l'importance de s'attarder à son cycle biogéochimique.

1.2.1 Abondances et concentration du CO dans l'atmosphère

Avec une concentration variant de 0,06 à 0,15 ppm, le CO fait partie des gaz traces les plus abondants dans l'atmosphère (Mörsdorf *et al.*, 1992). La haute variabilité spatiale de la concentration du CO fait en sorte qu'il est difficile d'estimer son abondance globale dans l'atmosphère. Selon le troisième rapport du (GIEC, 2001), le CO présente différents gradients dans l'atmosphère, et sa quantité totale serait d'environ 360 Tg, avec une incertitude plus grande que celles associées aux bilans du CH₄ et du N₂O. Les changements constants dans les sources et les puits du CO ainsi que des variations saisonnières de la chimie atmosphérique associée au CO expliquent la distribution du CO observée dans l'atmosphère (Figure 2) (Holloway *et al.*, 2000). Les concentrations moyennes dans la troposphère de l'hémisphère nord sont 2 ou 3 fois plus élevées (120 – 180 ppbv) que celles qui sont enregistrées dans l'hémisphère sud (60 – 70 ppbv). Les valeurs les plus élevées se retrouvent aux latitudes nordiques, reflétant l'importance de sa source anthropique: l'industrialisation. Des régions équatoriales vont également contribuer de manière significative à la production de CO, reflétant les grandes surfaces des sources végétales et des zones de combustion de biomasse (Figure 2). Le troisième rapport d'évaluation du (GIEC, 2001), suggère que la charge de CO atmosphérique a augmenté lentement jusqu'à la fin des années 1980. Cette tendance a changé rapidement où la charge du CO a diminué probablement en raison de la diminution des émissions des automobiles suivant l'introduction des convertisseurs catalytiques. Des suivis à long terme, faits à partir d'un réseau des sites d'échantillonnage distribués partout à l'échelle mondiale, indiquent que la charge de CO atmosphérique a diminué globalement d'environ 2% par année de 1991 à 1997 (Novelli *et al.*, 1998), mais a ensuite augmenté en 1998. Il semblerait que le budget actuel du CO soit tout près de l'équilibre, mais personne ne peut garantir la persistance de cet équilibre dans le futur, surtout dans le contexte du changement global marquant l'avènement de l'Anthropocène.



Source: <http://www.nasa.gov/centers/goddard/news/topstory/2004/0517mopitt.html>

Figure 2. Variation atmosphérique de la distribution globale du CO. Ces images représentent des mesures du CO à une altitude de 850 hPa. Les mesures ont été effectuées par l'instrument MOPITT (Measurements of Pollution in the Troposphere) sur le satellite «Terra». MOPITT est un instrument de type nadir (pointant verticalement vers le bas) qui mesure le rayonnement infrarouge à 4,7 μm et 2,2-2,4 μm . Il utilise la spectroscopie de corrélation pour calculer des observations et des profils de CO total dans la basse atmosphère. Les graphiques montrent les observations du CO (valeurs élevées en rouge) pour chaque saison, sur 4 ans d'opération (Mars 2000-Février 2004). Des niveaux élevés de pollution se trouvent dans les deux hémisphères, spécifiquement sur des zones urbaines en raison de la pollution liée à l'utilisation des combustibles fossiles (Chine) et sur les zones où la combustion de biomasse (Dans l'Amazonie et Afrique se produit à grande échelle et les sols dans ces zones ne sont pas trop efficaces en terme de consommation du CO). Crédit: Cathy Clerbaux, NCAR.

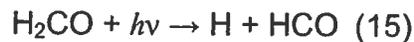
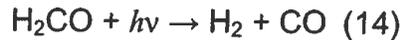
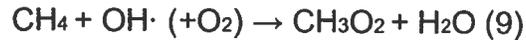
1.2.2 Budget

Il n'y a pas encore un rapport du budget de CO consolidé, car les différentes techniques de mesure et méthodes de modélisation de sa distribution mondiale sont affectées par des facteurs environnementaux tels que le transport de CO (par courants des vents), les saisons et certains emplacements spécifiques pour lesquels les sources ou les puits de consommation pourraient être sous-estimés. Cependant, il existe déjà quelques données expérimentales quantifiant les sources et les puits permettant d'extrapoler et d'estimer l'abondance et la distribution du CO atmosphérique (Holloway *et al.*, 2000, Novelli *et al.*, 1998). Le tableau 2 rassemble les différents rapports résumant le budget global du CO atmosphérique en utilisant des approches différentes. On peut observer les variations dans les valeurs moyennes des sources et des puits estimées par les différents auteurs, démontrant l'importance de mieux les documenter.

Tableau 2. Budgets de CO rapportés par différentes études (Tg an⁻¹).

References	(Holloway <i>et al.</i> , 2000)	(Hauglustaine <i>et al.</i> , 1998)	(Khalil <i>et al.</i> , 2000)	(Bergamaschi <i>et al.</i> , 2000)	(GIEC, 2001)
Sources					
Oxydation du CH ₄	760	881	400 – 1000	795	800
Combustibles fossile	300	381	300 - 600	641	650
Combustion biomasse	748	661.8	300 - 900	768	700
Végétation	Non rapporté	162.1	50 - 200	Non rapporté	150
Océans	Non rapporté	13	6 - 30	49	50
Oxydation des hydrocarbures	683	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	430
Total	2491	2100	1056 - 2730	2253	1230
Puits					
Sol (biologique)	Non rapporté	Non rapporté	150 - 500	250 - 640	Non rapporté
Chimique (OH·)	Non rapporté	Non rapporté	1400 - 2600	1500 - 2700	Non rapporté
Total			1550 - 3100	1750 - 3340	

Les données recueillies afin d'établir les budgets considèrent l'oxydation du CH₄ dans l'atmosphère, par l'intermédiaire du formaldéhyde, (équations 9 à 16) et les émissions anthropiques (la déforestation, combustion des déchets et savane, l'utilisation de combustibles fossiles et domestiques) comme principales sources de CO (Brasseur *et al.*, 1999).



Dans l'ensemble des budgets présentés au tableau 2, les émissions anthropiques représentent plus de 50% des sources de CO. L'oxydation photochimique de la matière organique dissoute (notamment dans les océans), la production par les plantes, les volcans et sources hydrothermales sont considérés moins importantes. Les rapports visant à quantifier les puits de consommation du CO sont limités dans la littérature. Tel que décrit précédemment, le puits du CO le plus remarquable est sa réactivité avec les OH· dans la troposphère.



Par ailleurs, les microorganismes du sol occupent un rôle important dans le bilan atmosphérique du CO en capturant ce gaz. Les valeurs d'absorption par sol sont très incertaines variant entre 150 et 640 Tg an⁻¹ (Tableau 2), ce qui représente environ 15 - 22 % du budget global du CO troposphérique (Conrad *et al.*, 1985). Bien que les taux de consommation du CO par le sol ne sont généralement pas pris en considération ou sont sous-estimés dans les modèles visant à prédire la distribution du CO à l'échelle globale, le potentiel d'absorption du CO par le sol est un sujet d'étude très important. Le rôle du sol dans le budget global du CO ne devrait pas être dévalorisé. Chaque terme du bilan atmosphérique du CO est caractérisé par une forte incertitude et les microorganismes du sol ne se limitent pas à capturer le CO déjà dans

l'atmosphère puisqu'ils ont la capacité de consommer également le CO produit dans le sol par des réactions photochimiques. Ces microorganismes sont donc un « biofiltre de CO », d'où l'importance de mieux connaître les acteurs et leur réponse au changement global.

1.2.3 Rôle du sol dans le bilan atmosphérique du CO

Contrairement à certaines études géophysiques, certaines études multidisciplinaires réalisées sur le terrain et en laboratoire ont démontré la pertinence des sols dans la distribution mondiale des gaz traces. Effectivement, le sol agit comme un régulateur de la chimie atmosphérique étant donné qu'il peut représenter à la fois une source ou un puits pour les gaz traces qui incluent le CH₄, le CO, le OCS, l'H₂, le NO₂ et le NO.

Le flux des gaz traces entre le sol et l'atmosphère est régulé par la production, la consommation et le transport (contraintes de diffusion) des gaz dans le sol et par leur concentration atmosphérique (Sanhueza *et al.*, 1994b). Dans le sol se présentent deux différents mécanismes de production ou de consommation des gaz traces: les processus chimiques et les processus biologiques. Dans le cas du CO, des réactions de décomposition thermique de la matière organique sont la source de production dominante dans le sol. Sur le terrain, le flux du CO entre le sol et l'atmosphère est fortement dépendant de la force de sa production chimique lorsque le niveau de carbone organique dans le sol ou quand la température du sol sont élevés (Conrad, 1996). Le flux est la résultante nette des réactions de production et de consommation du CO qui ont lieu simultanément, ce qui fait en sorte de les sols riches en matières organiques pourraient démontrer aucun échange net (production = consommation). Cet équilibre est cependant rarement soutenu dans l'environnement puisque la plupart des mesures ayant été réalisées sur le terrain montraient que le sol agissait bel et bien à titre de puits de CO.

La capacité d'oxydation du CO et des autres gaz par le sol est donc mieux comprise par la détermination de son « point de compensation », c'est à dire, le rapport entre les processus simultanés de production et de consommation du gaz en question à la surface du sol. Cette opération biologique suit l'équation suivante :

$$M_c = P/k \quad (18)$$

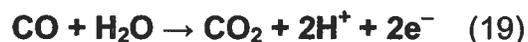
Où M_c représente le point de compensation (ppmv), P , la vitesse de production (ppmv min⁻¹) et k , la constante de consommation du gaz trace (min⁻¹). La consommation de gaz trace augmente avec sa concentration en suivant la cinétique de Michaelis – Menten. Au contraire, la production

des gaz trace est généralement indépendante de sa concentration (Conrad, 1996). Le « point de compensation », infère au sol une fonction de régulation sur l'abondance du CO au niveau global. Dans l'environnement, des concentrations de CO supérieures à ce point d'équilibre donnent comme résultat que le sol agit à titre de puits. Au contraire, les concentrations de CO plus basses que le point de compensation font en sorte que le sol libère le CO vers l'atmosphère (Conrad, 1994, Conrad *et al.*, 1985). Nous verrons également plus bas que l'affinité des microorganismes pour leur substrat influence les échanges gazeux du CO entre le sol et l'atmosphère puisque cette variable détermine « la compétence » qu'ont les microorganismes à capturer ou non les gaz traces selon leur concentration. Ces dernières observations démontrent à quel point il est difficile de prédire la réponse du puits biologique du CO atmosphérique au changement global, tout en donnant des arguments en faveur d'une caractérisation des acteurs responsables de l'activité dans le sol.

1.3 Bactéries oxydant le CO

Les bactéries oxydant le CO sont considérées comme une flore microbienne grandement répandue sur la surface de la Terre. Ces dernières sont probablement dérivées de l'évolution des bactéries autotrophes (e.g. chimiolithotrophes, hyperthermophiles et anaérobies) qui se sont développées en utilisant le CO comme seule source de carbone et d'énergie dans l'atmosphère primitive de la Terre (King *et al.*, 2007, Mörsdorf *et al.*, 1992, Ragsdale, 2004). Ces bactéries oxydant le CO sont pour la plupart hétérotrophes et taxonomiquement diversifiées. Elles auraient conservé cette voie métabolique (utilisation du CO) comme mécanisme conférant une plus grande versatilité métabolique et une forte capacité de survie (King *et al.*, 2007, Mörsdorf *et al.*, 1992, Oelgeschläger *et al.*, 2008).

Le terme «bactérie oxydant le CO» fait référence à la capacité de certaines bactéries d'oxyder le CO par réduction de l'O₂ ou autre accepteur d'électron, indépendamment de leur capacité à croître avec le CO comme seule source carbone et d'énergie. (King *et al.*, 2007). Le CO peut exercer les fonctions de source de carbone et d'électrons pour les organismes qui l'utilisent car il est une molécule très efficace pour la réduction des transporteurs d'électrons cellulaires, la capacité réductrice du CO étant 1000 fois plus puissante que le NADH (Ragsdale, 2004). Même si les bactéries oxydant le CO appartiennent à différents groupes taxonomiques et physiologiques possédant différents voies métaboliques pour l'utilisation du CO (e.g. anaérobie vs aérobie), tous ces systèmes oxydent le CO au CO₂ par la réaction suivante :



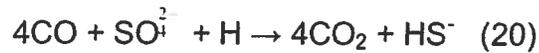
L'énergie produite par cette réaction d'oxydation peut être utilisée pour la génération d'une force protomotrice à travers la membrane cytoplasmique, conduisant à la formation d'ATP. Le carbone provenant du CO peut être incorporé directement dans un métabolite de la cellule (acétyl-CoA) ou le CO₂ produit de l'oxydation peut être fixé en biomasse par la voie métabolique du cycle de Calvin – Benson – Bassham CBB, le cycle des acides tricarboxyliques inverse (TCA), le cycle 3-hydroxypropionate ou la voie du Wood- Ljungdahl (Ragsdale, 2004). Dans les microorganismes incapables du fixer le CO₂ par la voie (CBB) ou autres mécanismes, le CO représente une source supplémentaire d'énergie qui ne contribue pas à la formation de biomasse mais serait utile pour la maintenance ou la survie. Dans ce cas-ci on parle du métabolisme mixotrophique (King *et al.*, 2007, Mörsdorf *et al.*, 1992, Ragsdale, 2004).

1.3.1 Anaérobie vs Aérobie

Le métabolisme du CO (19) représente une réaction énergétiquement favorable pour les microorganismes, puisqu'en plus du CO₂ se produit une paire d'équivalents réducteurs (ou hydrogène moléculaire), qui peut prendre différentes voies dépendamment du métabolisme principal de la bactérie oxydant le CO.

Dans des conditions anaérobies, le CO est utilisé avec une faible affinité et ces équivalents de réduction peuvent être couplés à la réduction des sulfates pour former sulfure (réaction 20), à la réduction du CO₂ pour former l'acétate (acetogénese, réaction 21) ou au CH₄ (méthanogénese, réaction 22). Également, certains microorganismes anaérobies oxydant le CO produisent de l'H₂ comme produit terminal avec une proportion équimolaire avec le CO₂ (King *et al.*, 2007, Oelgeschläger *et al.*, 2008).

La plupart bactéries réductrices des sulfates rapportées capables d'utiliser le CO comme source d'énergie transforment le CO en CO₂ et H₂ pour ainsi utiliser l'H₂ dans la réduction des sulfates (réaction 20). L'assimilation du CO₂ issus de la réaction se fait par la voie réductrice de l'acétyle – CoA (Oelgeschläger *et al.*, 2008).

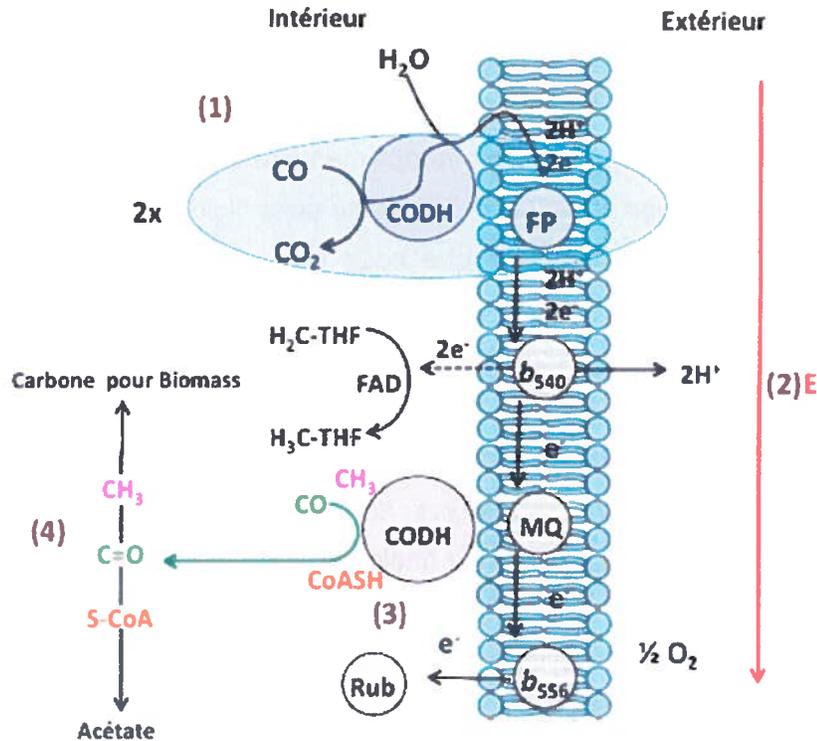


Les bactéries acétogènes sont un groupe anaérobie strict, qui forme de l'acétate à partir de substrats organiques ou du CO₂ par la voie réductrice de l'acétyle-CoA (Wood-Ljungdahl). Dans cette réaction, le CO est transformé en CO₂ (Figure. 3) et en énergie par la formation d'une force protomotrice à travers la membrane cytoplasmique, ce qui permet la synthèse d'ATP via un mécanisme chimiosmotique (Figure. 3).



Deux molécules de CO₂ sont fixées pour former l'acétyle-CoA. Une molécule de CO₂ est réduite pour former un groupement méthyle qui se lie à un coenzyme tétrahydroptérine (Figure 3 ; H₂C-, H₃C-THF). Une autre molécule de CO₂ est réduite en CO par le complexe CODH/ACS. Plus exactement, le CO est lié au nickel dans le site active de la CODH, qui agit également comme un acétyl-CoA synthase (ACS). Le CO donc, accepte le groupement méthyle de la tétrahydroptérine. Ce groupe méthyle se combine avec le CO pour former un groupe Ni-acétyl lié à l'enzyme (Figure. 3), qui ensuite est libéré avec la coenzyme A pour former l'acétyle-CoA

(Figure. 3)(Berg, 2011). L'utilisation du CO par bactéries acétogènes produit donc de l'énergie, de la biomasse, de l'acétate et du CO₂ (Mörsdorf *et al.*, 1992, Oelgeschläger *et al.*, 2008).



Adapté de Mörsdorf *et al.* 1992

Figure 3. Modèle d'utilisation du CO par *Clostridium thermoautotrophicum*, bactérie acétogène anaérobie oxydant le CO. Adapté de Morsdorf, 1992.

Les archaea méthanogènes anaérobies capables d'oxyder le CO en CO₂ (réaction 22) possèdent 3 différents voies métaboliques pour la production de CH₄ à partir du CO₂ telles que l'utilisation de l'H₂, des composés méthylés et l'acide acétique.



Le CO₂, généré par l'oxydation du CO, est utilisé comme accepteur d'électrons conduisant à la formation de CH₄ et la production d'énergie pour la croissance. Dans chacune des voies mentionnées auparavant, le CO₂ est réduit séquentiellement en CH₄ par des coenzymes liées aux intermédiaires, avec l'H₂, des composés méthyles ou l'acide acétique comme donneurs d'électrons. L'enzyme catalysant l'oxydation du CO dans les bactéries méthanogènes est également un système CODH/acétyl-CoA synthétase qui a la même

fonction métabolique que dans l'acétogènes, la synthèse de l'acétyl-CoA à partir de deux précurseurs de C, dont un est un carbonyle lié aux enzymes, dérivé du CO et qui est généré par la réduction du CO₂ (Mörsdorf *et al.*, 1992, Oelgeschläger *et al.*, 2008).

Par ailleurs, l'utilisation aérobie du CO se fait chez certains microorganismes chimiolithoautotrophiques facultatifs appartenant à divers groupes phylogénétiques. La possibilité d'utiliser le CO est largement répandue chez les bactéries aérobies, possiblement parce que le CO peut servir comme énergie supplémentaire lorsque les substrats organiques sont limitant (King, 2003c). Dans le cadre de l'étude du puits biologique du CO atmosphérique, ce groupe fonctionnel est plus important que ceux qui sont actifs en anaérobie puisque l'oxydation du CO atmosphérique a lieu en aérobie. Les modèles les mieux étudiés sont des membres des protéobactéries, par exemple *Oligotropha carboxidovorans*. Chez cette bactérie (Figure. 4), le CO est oxydé en CO₂ (réaction 19) par une CO-déhydrogénase associée à la membrane (CODH), les équivalents réducteurs résultant de l'oxydation du CO sont dirigés par une chaîne respiratoire indépendante, par la voie de l'ubiquinone (Q₁₀) et cytochromes (*b*₃₆₁ et *b*₃₆₃ - accepteur final des électrons) entraînant finalement la réduction de l'O₂ ou dans certains cas, la réduction des nitrates. Au cours de l'oxydation du CO, 4 protons provenant de l'eau sont transportés à travers la membrane cytoplasmique. La force protomotrice résultante peut être utilisée pour la production d'ATP. Le CO₂ produit lors de l'oxydation du CO peut être fixé en biomasse par la voie métabolique du cycle de Calvin-Benson-Bassham (CBB) (Dobbek *et al.*, 1999, King *et al.*, 2007, Mörsdorf *et al.*, 1992, Oelgeschläger *et al.*, 2008, Ragsdale, 2004). Dans des essais *in vitro* de l'enzyme de *O. carboxidovorans* montre que dans le processus d'oxydation du CO, deux CODH sont présentes: une associée à la membrane pour générer de l'énergie (Figure 4) et une seconde cytoplasmique dégageant de l'H₂ (Mörsdorf *et al.*, 1992).

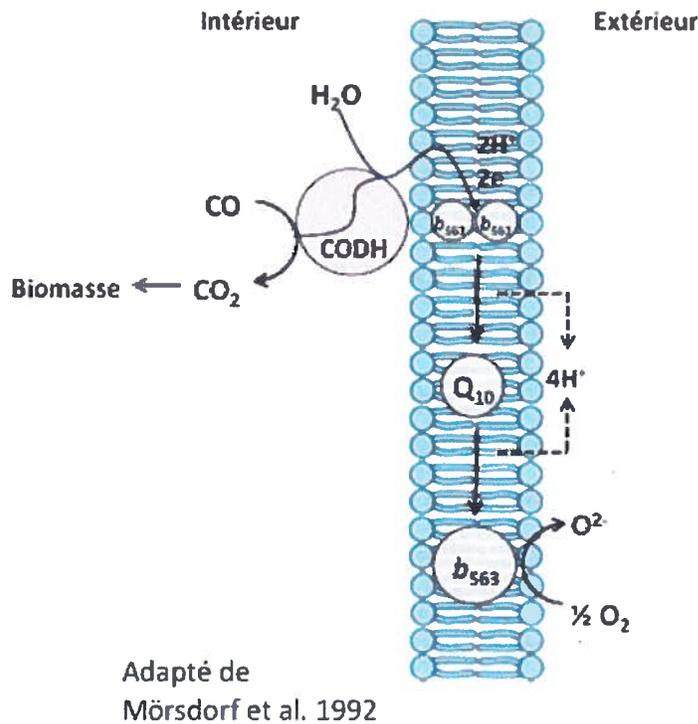


Figure 4. Modèle d'utilisation du CO par *Oligotropha carboxidovorans*, bactérie aérobie oxydant le CO. Source: Mörsdorf, 1992.

Un autre modèle de bactérie aérobie oxydant le CO bien connue est le genre *Mycobacterium*, le modèle mieux étudié est la espèce *Mycobacterium* sp. JC1. La plupart des mycobactéries étudiées à ce jour sont capables de se développer en aérobie avec CO comme seule source de carbone et d'énergie à l'aide de CODH et ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (RuBisCO) comme enzymes clés de l'oxydation et de l'assimilation du CO, respectivement. Le CO est donc converti en biomasse cellulaire via le cycle de Calvin (CBB). *M. tuberculosis* et autres espèces de *Mycobacterium* telles que *M. bovis* et *M. marinum* ne possèdent pas la voie enzymatique RuBisCO mais possèdent les enzymes nécessaires pour intégrer le CO₂ par la voie des acides tricarboxyliques (TCA). De la même façon que chez *Oligotropha carboxidovorans*, l'enzyme CODH se lie à la membrane cellulaire, contient des cytochromes de types *a*, *b* et *c* et aussi du groupe *o* qui sont insensibles au CO dans les fractions membranaires, ce qui indique la présence d'une chaîne respiratoire ramifiée dans cette

bactérie. Les cytochromes de types *b* et *o* sont fonctionnels pendant l'oxydation du CO tandis que les types *a* et *c* ne le sont pas. Par conséquent, l'accepteur d'électrons naturel pour l'oxydation du CO de la souche peut être une quinone chez *Mycobacterium* sp. JC1, ce qui est différent des ubiquinone-10 et du cytochrome de type *b* retrouvés chez *Oligotropha carboxidovorans*.

1.3.2 La monoxyde de carbone déhydrogénase (CODH)

La CODH (CO: oxydoréductase (accepteur)) est un transformateur d'oxydo-réduction chimique qui génère des électrons de haute énergie en catalysant l'oxydation du CO en CO₂ (réaction 19) permettant aux bactéries d'utiliser le CO comme source de carbone et d'énergie. La CODH est largement répandue parmi les groupes des bactéries et des archaea physiologiquement et phylogénétiquement diversifiés et représente une activité métabolique très ancienne. Même si l'origine de la CODH est difficile à déterminer en raison de la grande diversité dans les différents groupes taxonomiques et le transfert latéral de ses gènes, elle a probablement évolué d'un ancêtre commun (Oelgeschläger *et al.*, 2008). Deux types de CODH ont été caractérisés, les Mo-[2Fe-2S] FAD des bactéries aérobies, et les Ni-[4Fe-2s] des bactéries anaérobies. Ces dernières peuvent interagir dans des complexes avec l'acétyl-CoA synthétase (ACS) tel que décrit dans la section du métabolisme anaérobie. Dans ce document, peu de détails seront présentés pour l'enzyme CODH anaérobie car le projet de recherche porte exclusivement sur l'activité des bactéries aérobies oxydant le CO dans les sols.

La CODH aérobie appartient à la famille d'enzyme hydroxylase de molybdène et est constituée d'un dimère d'hétérotrimères symétriques rangés dans une structure de papillon (Figure 5A). Dans chaque dimère on trouve trois sous-unités. Il y a d'abord une petite sous-unité (17,8-kDa/166 résidus) qui contient des centres fer-soufre [2Fe-2S]. En second lieu, la moyenne sous-unité (30,2-kDa/288 résidus) est une flavoprotéine associée à une flavine adénine dinucléotide (FAD) qui est un co-facteur d'oxydoreduction facilitant le transport des électrons du site actif de l'enzyme jusqu'à l'accepteur final. Troisièmement, la grande sous unité (88,7-kDa /809 résidues), est une protéine molybdène qui porte le dinucléotide molybdoptérine-cytosine (MCD) qui coordonne l'atome de molybdène au niveau du site actif (Figure 5B et C). Le site actif contient un motif conservé constitué de cystéine, sérine, phénylalanine, l'arginine (AYCSFR). Le résidu cystéine conservé coordonne un atome de cuivre qui se lie également à l'atome de molybdène et est impliqué directement dans la réaction catalytique de l'enzyme (Figure 5D). Au

niveau de la réaction, les électrons sont d'abord transférés aux centres [2Fe-2S] de la petite sous-unité pour ensuite transiter au FAD de la moyenne sous unité (Dobbek *et al.*, 1999, Dobbek *et al.*, 2001). L'accepteur final d'électrons est typiquement l'O₂, mais le nitrate le peut le substituer en conditions anoxiques (King *et al.*, 2007).

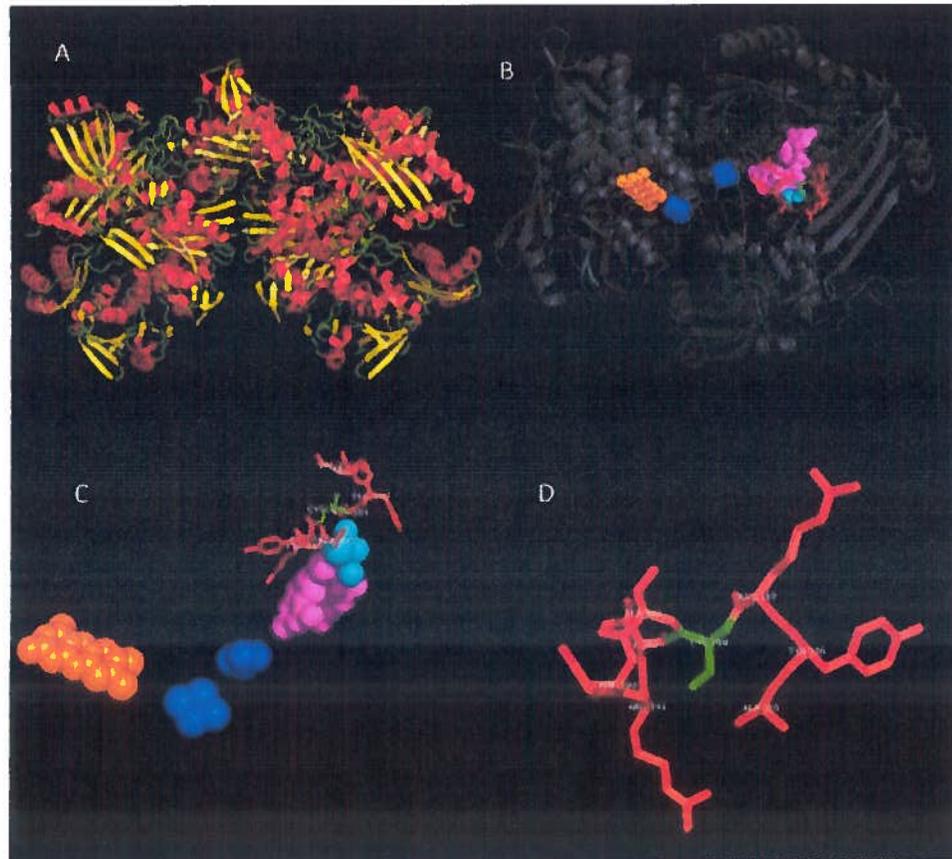


Figure 5. Modèle de la CODH d'*Oligotropha carboxidovorans*, (A) La structure cristalline montre des dimères symétriques des sous unités S, M et L. Les hélices sont présentées en rouge, les feuilletts β en jaune, et les boucles en vert. (B) Monomère de la CODH avec des cofacteurs. (C) FAD en orange, centres Fe-S en bleu, MCD en magenta, et Mo en cyan.(D) Site actif de l'enzyme caractérisé par la signature AYCSFR où le résidu cystéine essentiel est illustré en vert. Image visualisée par M. KHEDIRI en PYMOL.

Les gènes structuraux qui codent pour l'expression de la CODH sont inclus par l'opéron polycistronique *cox*. Ces gènes codent pour les composantes requises pour l'utilisation chimio-lithoautotrophique du CO. Les gènes *coxS*, *coxM* et *coxL* codent pour l'expression des petites, moyennes et grandes sous-unités de l'enzyme, respectivement. De plus, il existe un nombre variable de gènes accessoires dans l'opéron *cox*, l'ordre exact et la présence de ces gènes supplémentaires varient selon les isolats. La variation dans le contenu des gènes de l'opéron *cox* entre les espèces pourrait être liée à la différence de régulation de l'expression des gènes,

résultant probablement en différentes capacité d'absorption du CO (Cunliffe, 2011, King *et al.*, 2007).

Le gène *coxL* a été utilisé comme biomarqueur fonctionnel pour détecter la présence des bactéries oxydant le CO dans l'environnement, car il contient la région du gène qui spécifie le site actif de l'enzyme. Cette région conservée permet de différencier les deux formes connues de la CODH : la **forme I** ou fonctionnelle et la **forme II** ou hypothétique. La forme I de l'enzyme est caractérisée par une signature des acides aminés apparemment unique à la CODH suivant la configuration **AYXCSFR**. La forme II au contraire, semble être partagée par d'autres molybdènes hydroxylases avec différents substrats spécifiques. Le site actif se caractérise par la configuration **AYRGAGR** (King *et al.*, 2007), où l'on note l'absence du résidu cystéine qui coordonne le cuivre dans le CODH de forme I. Une autre observation qui distingue les CODH de forme I et II est l'arrangement de leur opéron *cox*. Dans les bactéries possédant la CODH de forme I, les gènes structuraux de l'enzyme sont transcrits dans l'ordre *coxMSL* (Figure 6), et sont encadrés par les gènes accessoires *coxDEF* (lignes rouges discontinues, Figure 6) qui composent l'ensemble minimal de l'opéron. Dans quelques autres opérons *cox* de forme I, les gènes *coxC* et *coxG* ont été retrouvés, dans une configuration finale *coxCMSLDEFG* et la présence et l'ordre des autres gènes accessoires varient selon les espèces (Cunliffe, 2011, King *et al.*, 2007). Pour sa part, l'opéron *cox* de la CODH de forme II comporte les trois gènes structuraux qui sont transcrits dans l'ordre *coxSLM* (Figure 6), encadrés par le gène *coxG*. Cet opéron de forme II est déficient pour plusieurs gènes accessoires. Selon l'isolat, les gènes *coxE* et *coxF* et *coxG* ont été détectés, mais ils n'encadrent pas les gènes structuraux *coxSLM*, étant plutôt encadrés par gènes non homologues aux gènes *cox* (lignes noire discontinues Figure 6). Cependant il n'y a pas un arrangement conservé pour les gènes de l'opéron *cox* de la CODH de forme II. De plus, les gènes *coxD* et *coxC* ne sont pas présents dans la forme II (Cunliffe, 2011, King *et al.*, 2007, Pelzmann *et al.*, 2009). La protéine accessoire *coxD* a été rapportée par Pelzman *et al.* (2009) pour participer à la biogenèse du site actif [CuSMoO₂] de l'apo-CODH de *Oligothropha carboxidovorans*, permettant l'introduction du S et Cu dans le site actif de l'enzyme. L'absence des gènes accessoires dans la CODH de forme II est importante à considérer puisque cela implique que les bactéries possédant cette enzyme serait incapables d'accomplir toutes les modifications post-traductionnelles requises pour générer une CODH fonctionnelle, comparable à la forme I de *O. carboxidovorans* (Cunliffe, 2011, King *et al.*, 2007).

Des études expérimentales ont montré une activité de consommation du CO par des isolats contenant exclusivement la forme I, ou les deux formes de la CODH (I et II) mais la

fonction de la seconde forme est encore imprécise (Cunliffe, 2011, King *et al.*, 2007). Plus d'informations seraient requises pour élucider le lien qui existe entre l'activité d'oxydation du CO par les bactéries et leur la présence des CODH de forme fonctionnelle (I) et hypothétique (II) pour bien définir le rôle physiologique des deux isozymes.

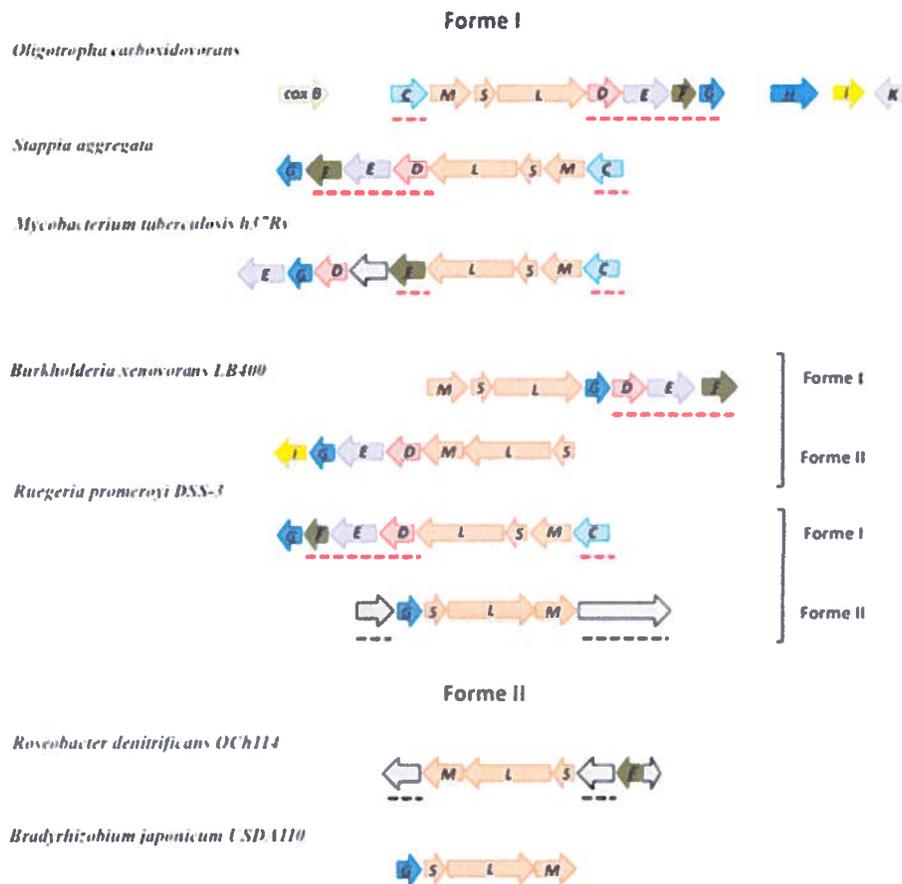


Figure 6. Organisation de l'operon *cox* dans différentes bactéries oxydant le CO. Sources : (Cunliffe, 2011, King *et al.*, 2007, Pelzmann *et al.*, 2009).

1.3.3 Carboxydovores vs Carboxydotrophes

King (2003) a rapporté pour la première fois que les bactéries aérobies oxydant le CO peuvent être distinguées selon leur affinité pour leur substrat : un groupe tolérant au CO, constitué d'isolats qui poussent à haute concentration de CO (*i.e.* bactéries carboxydotrophes) et un groupe sensible, inhibé par des concentrations supérieures à 1% de CO (*i.e.* bactéries

carboxydovores). King *et al.*, (2007) ont d'ailleurs défini les bactéries **carboxydotrophes** comme les bactéries qui préfèrent des substrats organiques comme sources de carbone et d'énergie, mais pouvant croître en utilisant le CO en concentrations élevées (>10%) et utiliser la voie métabolique de Calvin-benson-Bassham pour incorporer le CO₂ pour générer de la biomasse, tel que décrit dans les sections précédentes. Les carboxydotrophes expriment des systèmes de consommation du CO à faible affinité (K_m apparent, ≥ 500 ppmv). Bien que les rôles écologiques de ces organismes nécessitera plus d'études, plusieurs carboxydotrophes modèles ont fourni des renseignements importants au sujet de la biologie, de la biochimie et de la biologie moléculaire de l'oxydation de CO, avec *Oligotropha carboxidovorans* comme modèle principal. Parmi les carboxydotrophes rapportés dans la littérature on retrouve des hétérotrophes marines et terrestres appartenant aux α , β et γ -protéobactéries et les actinobactéries incluant les mycobactéries (King *et al.*, 2007). Selon King *et al.*, (2007), les bactéries **carboxydovores** ne peuvent pas croître en utilisant des concentrations élevées de CO (>1%), car le CO inhibe leur croissance à ces concentrations. Ces bactéries sont incapables de combler la totalité de leurs besoins énergétiques en utilisant le CO seulement. Au laboratoire, ces bactéries ont été cultivées avec des substrats organiques et de basses concentrations en CO permettant une croissance lente. Dans des conditions *in situ*, la consommation de CO par les carboxydovores pourrait avoir un rôle plus important dans le métabolisme mixotrophe, jouant le rôle de source d'énergie supplémentaire pour combler les besoins en énergie reliés à la maintenance ou la survie des cellules (King, 2003a, King *et al.*, 2007). À titre d'exemple, les bactéries marines *Roseobacter* spp. sont incapables d'assimiler le CO₂ généré par la CODH à partir du CO. Ce sont donc des bactéries carboxydovores caractérisées par un métabolisme chimio-lithohétérotrophe, leur permettant de croître selon un mode de croissance hétérotrophe, tout en utilisant le CO comme source d'énergie supplémentaire (Cunliffe, 2011). La capacité à utiliser simultanément le CO et des substrats organiques a également été documentée chez *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Pseudomonas carboxydohydrogena* et *Stappia aggregata* (Cunliffe, 2011, King, 2003b, King *et al.*, 2007, Mörsdorf *et al.*, 1992). Les conséquences écologiques de l'utilisation du CO de manière chimio-lithohétérotrophe sont importantes pour les bactéries puisque les populations utilisant cette source d'énergie supplémentaire seraient en mesure d'utiliser plus de carbone organique pour la biosynthèse, et auraient donc des avantages sur les populations qui n'ont pas accès à cette source d'énergie supplémentaire.

1.3.4 Affinité pour le CO

En général, la croissance avec un substrat nécessite que la concentration de ce dernier soit suffisante pour que le microorganisme soit capable de générer l'énergie requise pour (1) la survie, ainsi que pour (2) la biosynthèse de molécules nécessaires à la croissance. Cela signifie que par la consommation de gaz traces à partir de l'atmosphère, les microorganismes catalyseraient une réaction caractérisée par une variation de l'énergie libre (ΔG) négative (énergie de Gibbs < 0), ayant comme résultat une réaction exergonique. Pour la deuxième condition (biosynthèse), la réaction de consommation doit être suffisamment rapide pour répondre aux exigences de d'entretien et de réparation cellulaire. Cela signifie que le rapport V_{max}/K_m , doit être au moins aussi élevé que le coefficient de « ménage » (*maintenance* en Anglais), se référant à l'énergie minimale nécessaire à la survie des cellules (e.g. réparation de l'ADN). Comme il existe des limites pour augmenter V_{max} , c'est à dire, le nombre de molécules enzymatiques actives par cellule, la capacité de consommer les gaz traces à faibles concentrations est en fait limitée par la valeur relative du K_m , c'est-à-dire, décrit la force de l'interaction entre l'enzyme dans la cellule et le substrat. Ce dernier doit être suffisamment faible (le moindre le K_m de la bactérie, la plus haute est l'affinité pour le substrat). Cette limitation cinétique s'applique de façon générale et est critique pour les réactions aérobies, telles que l'oxydation des gaz traces (Conrad, 1996). En raison de ces restrictions, il n'est pas surprenant que les gaz traces soient rarement utilisés pour la croissance à partir du compartiment atmosphérique. Ces gaz sont plutôt utilisés dans des « hotspots » du sol, zones ou microenvironnements où ils se retrouvent plus concentrés. Cela explique pourquoi les gaz atmosphériques sont plutôt utilisés comme substrats supplémentaires pour soutenir la croissance microbienne (mixotrophie) ou comme co-métabolites sans promouvoir la croissance.

Le processus pour vérifier si le métabolisme de certains gaz traces dans le sol est le résultat de l'activité d'un microorganisme particulier se fait par l'étude de la cinétique de consommation du gaz en question. En particulier, les valeurs de K_m et le « seuil d'utilisation » qui sont observés dans les cultures microbiennes doivent être cohérents avec ceux observés dans le sol. Il faut donc comparer les paramètres cinétiques du microorganisme en question avec ceux observés dans l'environnement. Des études expérimentales montrent que l'affinité des bactéries aérobies isolées à partir du sol et oxydant le CO (K_m en μM) est généralement beaucoup plus faible que l'affinité observée par les sols (K_m en nM). Par conséquent, ces bactéries isolées ne peuvent pas être assumées responsables de l'activité de consommation du CO atmosphérique dans le sol. Seulement quelques isolats démontrant une haute affinité pour

le CO ont été rapportés dans la littérature. Mörsdorf *et al.*, (1992) a rapporté l'affinité pour le CO de *Oligotropha carboxidovorans* étant de 53 μM , Conrad *et al.*, (1981) a aussi rapporté l'affinité de *O. carboxidovorans* et d'autres bactéries carboxydrotrophes à affinité intermédiaire (Tableau 3). Par des essais *in vitro*, *Stappia* sp CV902, présentait un $_{app}K_m$ (c'est apparent (app) car il ne s'agit pas de l'enzyme pure mais de tests réalisés sur les bactéries, ce qui implique une limitation de l'activité par la diffusion du substrat dans la cellule en plus de celle associée à l'enzyme) de 87 ppm (Weber *et al.*, 2007b). Le K_m de la (CODH) purifiée des bactéries carboxydrotrophes à Gram négatif est de 0,6 à 63 μM . Le K_m de la CODH de *Mycobacterium* sp. JC1 est de 150 μM , ce qui est considérablement plus élevés que celles des bactéries à Gram négatif (Kim *et al.*, 2012a). La consommation du CO par le sol exige des systèmes d'assimilation à haute affinité qui permettent une utilisation efficace du CO dans le spectre de <0,1 jusqu'à 0,3 ppm (Hardy *et al.*, 2001a). Le tableau 3 montre l'affinité ($_{app}K_m$) du sol pour le CO et ainsi que l'affinité des microorganismes en général, rapportés par différentes études.

Tableau 3. Affinité pour le CO. Parallèle entre l'affinité des sols de des microorganismes carboxydovores et carboxydrotrophes du sol.

Auteurs	(Conrad, 1996)	(King, 1999a)	(Conrad <i>et al.</i> , 1981)
Sol - K_m	0,005–0,05 μM	0,18 μM	0,004 - 0,007 μM
Microorganismes - K_m	0,4–0,95 μM		53 μM

1.4 Quel est le destin du puits biologiques du CO

Différents auteurs manifestent dans leurs études le besoin de continuer à investiguer l'impact du changement global sur la composition des communautés microbiennes oxydant le CO atmosphérique et d'autres gaz traces. Le succès de ces travaux reposera sur le développement de méthodes pour identifier la diversité des bactéries oxydant le CO atmosphérique et identifier celles qui sont actives dans le sol. Le défi inclus également la génération de modèles mathématiques visant à prédire l'effet des changements dans la distribution et l'activité des bactéries oxydant le CO atmosphérique sur l'activité de consommation du CO par le sol, en relation avec les conditions environnementales de l'écosystème (Schimel *et al.*, 1998). Pour cette modélisation, nous aurions besoin d'identifier : (i) les différents genres ou groupes de bactéries qui participent à l'activité de consommation du CO et les caractériser (cinétique de consommation, capacité à s'ajuster aux altérations des conditions environnementales) et, (ii) comment l'abondance relative et l'activité des bactéries oxydant le CO atmosphérique pourraient changer dans des conditions environnementales altérées (Schimel *et al.*, 1998). La prédiction des effets des altérations environnementales sur les bactéries oxydant le CO atmosphérique peut être abordée en suivant diverses étapes (Ingersoll *et al.*, 1974, Schimel *et al.*, 1998).

- (i) Déterminer quels sont les groupes fonctionnels (actifs) oxydant le CO atmosphérique et vérifier s'ils ont tendance à être plus actifs ou à disparaître.
- (ii) Définir s'il y a différentes physiologies (*i.e.* réponses à la température selon l'espèce) entre les groupes de bactéries oxydant le CO atmosphérique.
- (iii) Déterminer la distribution de populations des bactéries oxydant le CO atmosphérique dans la nature selon le climat, la structure de l'écosystème et les propriétés du sol.
- (iv) Déterminer l'influence des changements environnementaux sur la composition des communautés microbiennes oxydant le CO atmosphérique
- (v) Générer des modèles biogéochimiques qui intègrent la façon dont le changement global contrôle la distribution et l'activité des bactéries oxydant le CO.

La quantification des réponses des communautés microbiennes oxydant le CO dans le sol demande la combinaison d'approches microbiologiques et biogéochimiques traditionnelles avec des techniques de biologie moléculaire et biostatistiques qui nous permettront de

documenter les relations entre les facteurs environnementaux et les flux du CO dans les écosystèmes.

1.4.1 Facteurs environnementaux vs activité de consommation du CO

La plupart des processus de production et consommation du CO et d'autres gaz traces dans le sol dépendent essentiellement de la composition des communautés bactériennes, des facteurs environnementaux propres à chaque écosystème et de la capacité de diffusion des gaz variant selon certains attributs physiques du sol tels que la teneur en eau, la texture, la porosité et la température (Ingersoll *et al.*, 1974, King, 2000, Sanhueza *et al.*, 1994a). Le flux de transport du CO dans la surface du sol suggère une activité d'oxydation rapide en surface et une très courte durée de vie dans les premières 5 à 10 cm de la surface. Dans les couches plus profondes, l'activité est presque nulle en raison de diffusion du CO et de l'O₂ limitées par l'humidité et les caractéristiques physiques de sol (Sanhueza *et al.*, 1994b). Par exemple, la texture du sol peut limiter la diffusion du CO dans le sol, selon sa capacité de drainage. Les sols de texture sablonneuse drainent plus facilement que des sol limoneux et facilite le transfert des gaz (Conrad *et al.*, 1985). L'irrigation et l'humidité du sol ont également des effets importants dans le transport du CO dans le sol et par conséquent sur l'activité biologique. L'augmentation de l'humidité diminue la diffusion des gaz dans le sol et réduit les échanges gazeux entre l'atmosphère et le sol.

Par ailleurs, la température module les processus de production et de consommation du CO. Par exemple, à des températures supérieures ou à environ 25 - 30°C, la production de CO augment et surpasse capacité de consommation du sol, ce qui cause une émission nette du gaz vers l'atmosphère (King, 1999c).

Le rôle des nutriments sur les échanges de CO est moins bien documenté. À titre d'exemple, la consommation de CO semble affectée, dans certains cas, par la fertilisation du sol avec des engrais azotés. Selon King (1999a), l'azote exogène stimule la consommation de CO dans les sols agricoles, suggérant un rôle majeur des bactéries oxydant l'ammoniac dans la consommation du CO. Cependant, l'importance des bactéries oxydant l'ammoniac dans les sols non agricoles n'est pas claire (King, 1999c). Selon plusieurs auteurs (Chan *et al.*, 2006, Ingersoll *et al.*, 1974, Moxley *et al.*, 1998a, Moxley *et al.*, 1998b), les sols agricoles fertilisés présentent un taux de consommation du CO considérablement plus faible que celui des sols forestiers. Il est généralement accepté que l'activité de consommation du CO par le sol n'est pas limitée par

la disponibilité de l'azote, mais plus de travaux seraient nécessaires pour confirmer cette généralité.

L'impact combiné du contenu d'eau dans le sol, la composition et concentration de matière organique, la température et l'écophysologie des bactéries oxydant le CO dans différents types des sols sur la consommation du CO n'est pas encore complètement compris et motive l'élaboration du sujet de recherche choisi pour ce travail.

1.4.2 Impact de l'utilisation des terres sur le bilan du CO atmosphérique

Les différents modes d'utilisation des terres ont transformé une grande partie de la surface de la planète. La déforestation issue de l'intensification de la production des terres agricoles ou de l'expansion des centres urbains est en train de changer le paysage d'une façon globale. Bien que les pratiques d'utilisation des terres varient considérablement à travers le monde, leur résultat est généralement le même: l'acquisition de ressources naturelles pour des besoins humains immédiats, suivi de la dégradation des conditions environnementales. Les changements dans l'utilisation des terres sont connus pour causer des altérations dans les communautés microbiennes au niveau taxonomique, mais les modifications dans la composition des groupes fonctionnels microbiens (tels que les bactéries oxydants le CO) ne sont pas faciles à identifier (Mirza *et al.*, 2014).

L'équilibre entre la consommation microbienne et la production abiotique simultanée détermine la force et la direction des échanges de CO entre le sol et l'atmosphère. Les changements relatifs dans les deux processus peuvent bouleverser le régime des échanges, faisant en sorte qu'un écosystème passe d'un puits à une source nette de CO par exemple. Ces changements ont été observés dans les sols des régions tempérés et tropicales en fonction du contenu en eau, des températures et du labourage (Conrad *et al.*, 1985, Moxley *et al.*, 1998a, Sanhueza *et al.*, 1998, Sanhueza *et al.*, 1994b). Le changement dans l'utilisation des terres peut conduire à des altérations à long terme dans les flux de CO entre le sol et l'atmosphère; la conversion des forêts ou des prairies en terres agricoles conventionnelles, donne comme résultats des concentrations de matière organique plus faibles dans les sols, ce qui fait un sorte que la production de CO soit inférieure et la consommation du CO augmente (King, 1999c, King, 2000a). En accord avec cette observation, plusieurs équipes de chercheurs (King, 1999c, King, 2000a, King *et al.*, 2002b, Pendall *et al.*, 2010, Sanhueza *et al.*, 1994b) rapportaient que la pratique de l'agriculture améliore la consommation nette du CO atmosphérique en réponse à la perte de matière organique dans les sols en plus des changements dans le pH et le contenu en

eau du sol. Cet impact de l'agriculture sur les flux du CO varie cependant selon les différents types de sol, puisque certaines pratiques ne permettent pas la perte de la matière organique (e.g. absence de labourage et aération), limitant ainsi la consommation du CO par ces sols agricoles. L'application de pesticides et d'herbicides et l'utilisation de feux pour nettoyer les champs, pourraient aussi affecter la consommation du CO par les sols, mais ces facteurs sont encore peu documentés. En revanche, d'autres rapports (Chan *et al.*, 2006, Ingersoll *et al.*, 1974, Moxley *et al.*, 1998a) indiquent que les taux de consommation du CO par les sols agricoles est considérablement bas par rapport à ceux rapportés dans les forêts tempérées.

Il est encore difficile ou voire impossible de prédire avec confiance la direction ou l'intensité de la variation du puits biologique du CO atmosphérique en réponse au changement global. Les interactions entre les régimes hydriques, la température et la matière organique et les variations dans des populations microbiennes sont les facteurs les plus importants pour répondre à cet enjeu.

1.5 Problématique: absence de marqueur pour l'activité dans le sol

L'évaluation de la diversité microbienne fonctionnelle est difficile, car elle nécessite la détection et la quantification des macromolécules qui sont typiques d'une fonction physiologique précise, « des biomarqueurs ». Dans le cas des bactéries oxydant le CO, le biomarqueur utilisé est le gène *coxL*, qui code pour la grande sous unité de la CODH. Ce biomarqueur n'a pas été validé dans la littérature puisque peu de liens entre sa détection et l'activité de consommation du CO ont été réalisés. Les études réalisées jusqu'à maintenant sont pour la plupart descriptive rapportant la diversité des séquences *coxL* ainsi que l'abondance de certains groupes phylogénétiques spécifiques, sans pour autant définir la spécificité des séquences. En général, les marqueurs d'activité dans le sol doivent être assez stables et universels pour répondre à trois points importants (Schimel *et al.*, 1998):

(i) Lier la composition et l'activité métabolique des communautés microbiennes avec la composition et le fonctionnement de l'écosystème.

(ii) Permettre une détection sensible et une identification précise des microorganismes appartenant au groupe fonctionnel d'intérêt. Ces outils moléculaires doivent être capables de détecter des organismes « actifs », même dans des populations qui n'ont pas encore été caractérisées.

(iii) Pour être capable de proposer et valider des hypothèses par rapport à la distribution du groupe fonctionnel d'intérêt, le marqueur doit être facile à quantifier pour son utilisation dans des analyses statistiques qui aident à démontrer les liens entre les populations et les processus biogéochimiques.

L'utilisation et la validation de ces marqueurs dans les sols représente donc un défi considérable, surtout pour les utiliser dans le but de prédire les processus biogéochimiques.

1.6 Hypothèses

Une revue de la littérature démontre que les échanges gazeux du CO ayant lieu entre le sol et l'atmosphère sont influencés par les modes d'utilisation des terres. Cet impact significatif sur l'activité de consommation de CO par le sol serait induit par la modification de la composition des communautés des bactéries « carboxydovores » en réponse aux perturbations de leur milieu. Les sols démontrant des activités d'oxydation du CO spécifiques se distingueraient donc en fonction du profil génétique du gène *coxL*. Ces variations de profils se traduiraient par la présence de phylotypes spécifiques à certains écosystèmes et les sols les plus actifs démontreraient une plus grande abondance de gène *coxL* que les sols démontrant une activité de consommation du CO plus faible.

1.7 Objectifs

Les hypothèses énoncées précédemment ont été testées en répondant à trois objectifs spécifiques qui consistent à :

Établir une base de données rassemblant les séquences *coxL* disponibles dans les bases de données publiques pour ensuite développer des oligonucléotides dégénérés pour détecter les gènes *coxL* appartenant aux CODH de forme I et aux CODH de forme II.

Prélever des échantillons de sol dans des écosystèmes contrastants adjacents pour évaluer l'impact du changement d'utilisation des terres et des propriétés physico-chimiques du sol sur la diversité du gène *coxL* dans le sol. Cet objectif a été accompli par la construction et l'analyse de génothèques *coxL* répliquées combinées à des analyses statistiques multivariées.

Finalement, certaines séquences *coxL* dont la présence était associée à une forte activité de consommation du CO dans le sol ont été identifiées pour développer des indicateurs moléculaires de l'activité de consommation du CO atmosphérique. Ces derniers ont été validés par qPCR, permettant de les quantifier dans le sol.

**Land-Use Influences the Distribution and Activity of High
Affinity CO-Oxidizing Bacteria Associated to type I-coxL
Genotype in Soil**

ARTICLE

Chapitre 2: Article

Titre

Impact of Land-Use on the Distribution and Potential Activity of CO-Oxidizing Bacteria in Soil.

Auteurs

Liliana Quiza, Isabelle Lalonde, Claude Guertin and Philippe Constant

Running title:

CO-oxidizing bacteria in soil

Journal

Frontiers in Microbiology (Frontiers in Terrestrial Microbiology section)

État actuel:

Publié

2.1 Contributions à l'article

Les travaux ont mené à une publication publiée dans le journal *Frontiers in Microbiology* en juin 2014. L'ensemble du développement et de la mise au point des outils moléculaires (PCR et qPCR) conçus pour ce projet, l'échantillonnage des sols ainsi que toutes les manipulations au laboratoire, à l'exception des analyses physicochimiques des sols (carbone, azote, phosphore et potassium) et le séquençage des gènes *coxL*, ont été réalisés par Liliana Quiza. Elle aussi a contribué aux analyses statistiques, à l'interprétation des résultats et la rédaction des sections « Introduction » et « Matériels et méthodes » du présent article. Isabelle Lalonde a contribué à l'assemblage des séquences de la base de données *coxL*, ainsi qu'à l'élaboration des génothèques *coxL*. Philippe Constant a été responsable de la conception et de la supervision du projet, a contribué à l'analyse et l'interprétation des données statistiques et a écrit la version finale du manuscrit. Claude Guertin a introduit l'équipe aux sites d'échantillonnage et a commenté le manuscrit.

2.2 Résumé

Les bactéries carboxydovores du sol sont responsables du puits biologique du monoxyde de carbone atmosphérique (CO). La réaction est catalysée par une CO-déhydrogénase (CODH), avec le gène *coxL* codant pour la grande sous-unité de l'enzyme. Jusqu'à présent, très peu d'isolats carboxydovores ont démontré la capacité à oxyder le CO atmosphérique et l'impact potentiel du changement climatique sur l'écophysiologie de ce groupe fonctionnel est encore indéterminé. L'objectif principal de cette étude consistait à évaluer l'impact de l'utilisation des terres et les propriétés physicochimiques du sol sur la diversité génétique du gène *coxL* et à identifier des indicateurs moléculaires pour prédire l'activité de consommation du CO atmosphérique dans le sol. Des échantillons de sol ont été prélevés dans trois sites voisins mais qui présentaient différents mode d'utilisation des terres, à savoir: une forêt de feuillus, une plantation de mélèzes et un champ de maïs. L'activité de consommation du CO était reliée à la teneur en carbone total et en azote dans le sol, avec une activité plus forte observée dans le sol de la forêt de feuillus. Une base de données *coxL* a été assemblée pour optimiser la détection du gène *coxL* par PCR ciblant séquences appartenant à la CODH fonctionnelle de type I et la CODH hypothétique de type II. Des génothèques *coxL* répliquées ont dévoilé une signature moléculaire unique dans le sol de la forêt de feuillus, avec l'enrichissement des séquences *coxL* de type I. Les profils génétiques dans la plantation de

mélèzes et le champ de maïs n'étaient pas statistiquement différents et montraient un niveau de richesse génétique de *coxL* plus haut que la forêt de feuillus. Dans une analyse d'ordination canonique, le contenu en eau et l'activité de consommation du CO dans le sol expliquaient 38% de la variation des profils géniques *coxL*, conduisant à l'identification de séquences appartenant aux δ -protéobactéries comme indicateur de l'activité de consommation du CO à haute affinité. La performance de cet indicateur et l'enrichissement des séquences *coxL* de type I et δ -protéobactéries dans le sol de la forêt de feuillus ont été confirmée par qPCR dans une analyse indépendante. Pour terminer, l'analyse de l'activité de consommation du CO chez des bactéries carboxydovores modèles suggère qu'une fraction significative des bactéries oxydant le CO détectées par qPCR étaient actives dans le sol, ce qui révèle que l'utilisation des terres stimule la diversification de ce groupe fonctionnel dans l'environnement.

2.3 Abstract

Soil carboxydovore bacteria are the biological sink of atmospheric carbon monoxide (CO). The initial oxidation of CO is catalyzed by a CO-dehydrogenase (CODH), and the gene *coxL* encodes the large subunit of the enzyme. Only a few carboxydovore isolates were shown to oxidize atmospheric CO and little is known about the potential impact of global change on the ecophysiology of this functional group. The main objective of this study was to assess the impact of land-use and soil properties on *coxL* gene diversity and identify molecular indicators for the soil uptake of atmospheric CO. Soil samples were collected in three neighboring sites encompassing different land-use types, namely deciduous forest, larch plantation and maize field. CO uptake activity was related to total carbon and nitrogen content in soil, with the highest activity observed in deciduous forest. An extensive *coxL* database was assembled to optimize a PCR detection assay targeting sequences belonging to functional type I-CODH and hypothetical type II-CODH. Fully replicated *coxL* gene libraries unveiled a unique molecular signature in deciduous forest soil, with enrichment of type I sequences. Genetic profiles of larch and maize monocultures were not statistically different and showed higher level of *coxL* gene richness than deciduous forest. Soil water content and CO uptake activity explained 38% of the variation of *coxL* gene profiles in a canonical ordination analysis, leading to the identification of sequences belonging to the δ -*Proteobacteria* cluster as indicator for high affinity CO uptake activity. Enrichment of type I and δ -*Proteobacteria* *coxL* sequences in deciduous forest were confirmed by qPCR in an independent soil survey. CO uptake activity in model carboxydovore bacteria suggested that a significant fraction of detected putative high affinity CO oxidizers were active in

soil. Land-use was a driving force separating *coxL* diversity in deciduous forest from monocultures.

2.4 Introduction

Carbon monoxide (CO) is present at the trace level in the atmosphere, with typical background levels ranging from 1 ppmv in urban areas to 0.1 ppmv in remote locations (Chan *et al.*, 2002, Novelli *et al.*, 1998). A combination of modeling approaches attributed biogenic hydrocarbons and methane oxidation, biomass burning and fossil fuel utilization as the main sources of CO in the atmosphere, representing 2,500 Tg CO yr⁻¹ global emissions (Holloway *et al.*, 2000). This trace gas has a relatively short atmospheric lifetime of 0.4 to 2 months, owing to its strong reactivity towards hydroxyl radicals (OH·), the cleansing molecules in the atmosphere. Because of this OH·-mediated reaction, CO indirectly influences the distribution of methane, and thus is considered as an indirect greenhouse gas (Daniel *et al.*, 1998). The uptake of atmospheric CO, catalyzed by specialized microorganisms thriving in oxic soil, is the most uncertain term of CO budget, representing about 15% of the global loss of this trace gas in the atmosphere. Despite the fact that industrialization has increased CO global emissions in the last century (Assonov *et al.*, 2007), current CO concentrations are relatively stable in the atmosphere. Long-term time series analysis unveiled slight but significant decreasing trends of CO concentration in response to reduced industrial and motor vehicle emissions, disturbed by episodic CO pulses originating from forest fires (Chevalier *et al.*, 2008, Novelli *et al.*, 2003). This delicate balance in the atmospheric burden of CO largely relies on microbiological and chemical processes responsible for the abatement of global emissions. Resilience, resistance, or vulnerability of the biological sink of CO to global change, including changes in land-use and climate, must be assessed to predict the fate of atmospheric CO budget. Identification and characterization of soil CO-oxidizing bacteria are mandatory to achieve this challenging task.

In general, CO is a highly toxic gas due to its high affinity to metal-containing enzymes involved in respiratory chains. Sophisticated CO-insensitive metabolisms have evolved in bacteria adapted to exploit this trace gas distributed ubiquitously in the environment. CO-oxidizing bacteria possess a CO-dehydrogenase (CODH) catalyzing the reaction: $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$. The enzyme is a member of the molybdenum-containing hydroxylases comprising aldehyde oxidoreductase and xanthine dehydrogenase participating in purine nucleotide metabolism (Hille, 2005). In aerobic CO-oxidizing bacteria, CODH is a dimer of

heterotrimers consisting of the small (CoxS), medium (CoxM) and large (CoxL) subunits (Dobbek *et al.*, 2002). The active site embedded in the large subunit comprises a dinuclear molybdenum and copper heterometal cluster unique to CODH. Two physiological groups of aerobic CO-oxidizing bacteria have been identified. Carboxydrotrophic bacteria are generally facultative chemolithoautotrophs, using CO as a sole carbon and energy source if organic substrates are growth limiting (Mörsdorf *et al.*, 1992). These bacteria have a low affinity towards CO and are incapable of scavenging atmospheric CO (Conrad *et al.*, 1981). In contrast, carboxydovore bacteria cannot grow in presence of elevated level of CO. These bacteria exhibit a versatile mixotrophic metabolism, allowing them to grow on mixtures of inorganic and organic substrates (King *et al.*, 2007). In soil, carboxydovore bacteria scavenge atmospheric CO and take advantage of CO diffusing in soil from nitrogen-fixing nodules as well as chemical degradation of organic matter.

A few high affinity carboxydovore bacteria have been isolated so far and very little is known about the environmental control on their distribution and activity (King *et al.*, 2007). Phylogenetic analysis of *coxL* gene sequences revealed the occurrence of two different groups of CODH, namely the functional type I-CODH and the hypothetical type II-CODH. Type I-CODH are the most extensively studied and are found in the model carboxydrotrophic bacterium *Oligotropha carboxidovorans* as well as carboxydovores such as *Stappia* and *Mycobacterium* isolates demonstrating the ability to scavenge atmospheric CO (King, 2003a, King, 2003c, Weber *et al.*, 2007a). Comparatively less is known about the second group, since the occurrence of a functional type II-CODH never has been reported. Distribution of type I- and type II-*coxL* sequence has been investigated in the environment. Although both phylogenetic groups are ubiquitous in soil, the environmental control on their distribution remains to be elucidated. The objective of this study is to assess the impact of land-use on carboxydovore activity and diversity. We tested the hypothesis that adjacent sites encompassing different land-use types harbour distinct CO-oxidizing bacterial community structure and density, resulting in a site-specific CO uptake activity and *coxL* diversity profile. Soil physicochemical parameters, known to vary within the three ecosystems, such as carbon content and pH, were expected to explain the spatial distribution of this functional group in soil due to the importance of these factors in shaping soil microbial communities structure (Vasileiadis *et al.*, 2013).

2.5 Material and Methods

2.5.1 Sites and sampling

Soil samples were collected at the Verchères Arboretum in St. Amable, (QC, Canada), located about 40 km from Montreal on the south shore of the St. Lawrence River (45°67'N; 73°32'W). The landscape of the sampling site is a mosaic encompassing a broad range of ecosystem types arranged over a relatively small area (< 1 km²). Among these ecosystems are tree nurseries (e.g. spruce, larch, pine) established by the *ministère des ressources naturelles-Québec* (MRNQ) for seed production to support reforestation programs. Fifteen years ago, the MRNQ converted part of the original agricultural area to tree plantations, leaving some parcels for agronomic production as well as unseeded lands that led to the emergence of a natural deciduous forest (MRNQ, personal communication). For the purpose of this study, three adjacent areas with contrasting land-use types were sampled: maize monoculture area (stations A1, A2, A3), hybrid larch (*Larix marschlinsii* Coaz) plantation established by the MRNQ (stations M1, M2, M3) and the natural deciduous forest (stations F1, F2, F3). Three stations were identified in each ecosystem to collect composite soil samples (3 land-use types × 3 stations = 9 composite samples). Each composite soil sample consisted of six subsamples collected along a 2-meter radius traced from a central point. The A-horizon was collected, from the soil surface to a depth of 10 cm as this zone comprises the highest CO uptake activity (King, 1999c). Surface litter in the forests and debris from the previous crop in the maize sites were removed before sampling. Samples were placed in plastic bags and transferred at 4°C within 2-4 hours following their collection in the field. All samples were stored less than 3 months before laboratory analyses. A first soil survey was undertaken in April 2012. Soil of the maize monoculture was bare and unplowed, with a few crop residues remaining on the surface. Samples were used for CO uptake measurements, physicochemical analyses and *coxL* clone libraries. Sampling sites were visited for a second soil survey in November 2013. In contrast to the first survey, crop residues (*i.e.* senescent maize) resulting from plowing, were present at the maize monoculture sampling sites. Soil samples collected in 2013 were used for CO uptake and *coxL* qPCR assays.

2.5.2 Soil physicochemical properties

Soil texture was determined with the hydrometer method and particle size distribution (Table 1) assigned soil samples to the silt loam textural class (Elghamry *et al.*, 1962). Soil pH was analyzed in soil:water suspensions (1:2) and soil water content was measured using standard gravimetric method. Soil nutrients were analyzed in external service laboratories (INRS-Centre Eau, Terre et Environnement, QC, Canada). Phosphorus and potassium were analyzed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-AES) after acid extraction, while total carbon and total nitrogen soil content were determined using an elemental combustion system.

2.5.3 Microorganisms

Mycobacterium smegmatis (DSMZ 43756) and *Stappia kahanamokuae* (DSMZ 18969) were purchased at the Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, while *Burkholderia xenovorans* LB400 was kindly provided by the laboratory of Dr. Michel Sylvestre (INRS-Institut Armand-Frappier). *M. smegmatis* and *Burkholderia xenovorans* were grown in PYE broth (Kimble *et al.*, 1995) and Bacto Marine Broth (Difco 2216) was used for the growth of *Stappia kahanamokuae*. Cultures were incubated at 30°C under 200 rpm agitation. Triplicate cultures dedicated to CO uptake measurements (20 ml) were incubated in gastight 500 ml Wheaton® glass bottles equipped with a rubber septum cap. Defined volume of CO gas mixture (508 ± 10 ppmv CO, GST-Welco, PA, U.S.A.) was injected to get ~3 ppmv in the static headspace after inoculation. Headspace samples were collected during the incubation period to measure CO oxidation activity (see below). Independent triplicate cultures were also prepared in parallel to monitor bacterial growth by optical density readings. The biomass of stationary phase cultures was quantified by agar plate enumeration using PYE and Bacto Marine agar media.

2.5.4 CO uptake activity

CO uptake activity was measured using either soil samples (~50 g_(dry basis)) or bacterial cultures. Soil samples were placed into 500 ml gastight Wheaton® glass bottles with rubber septum caps. Diffusion limitation of the activity was negligible since preliminary experiments showed proportional CO uptake activity as a function of the amount of soil in the assay using 25, 50, 75 and 100 g soil samples (data not shown). Bottles containing soil samples were tightly closed and CO gas mixture (508 ± 10 ppmv CO GST-Welco, PA, U.S.A.) was injected to get ~1

ppmv initial concentration in the static headspace. Decrease of the CO mixing ratio was monitored as a function of time by analyzing aliquots (10 ml) of the headspace air in a Trace Analytical Reduced Gas Analyzer (ta3000R, Ametek Process Instruments®, DE, U.S.A.) as previously described (King, 1999b). Apparent first order CO uptake rate constants were obtained by integrating the logarithmic decrease of headspace CO mixing ratio. Measurements were performed using biologically independent triplicates and at least five CO concentration points were used for data integration. Experiments involving soil samples were accomplished over 20-60 minutes, depending on microbial activity. CO uptake activity in bacterial cultures was measured over a 7-day period. Cell-specific CO oxidation rate ($\text{pmol c.f.u.}^{-1} \text{h}^{-1}$) was calculated by normalizing the activity to biomass as determined by agar plate enumeration. Reproducibility of the CO analyses was assessed before each set of measurements by repeated analysis of certified CO standard gas (2.05 ± 0.10 ppmv, GST-Welco, PA, U.S.A.), and standard deviations were lower than 5%. No significant CO uptake was observed for blank experiments involving sterile media or empty glass bottles. Considering the occurrence of simultaneous CO production and consumption activities in nature and their dependence on temperature, moisture and solar radiations, rates of CO oxidation in soil presented in this study must be considered as potential CO uptake activities.

2.5.5 *coxL* phylogenetic analysis and PCR detection assays

Sequences similar to *coxL* in *Mycobacterium smegmatis* (type I-CODH) and *Burkholderia xenovorans* (type I- and type II-CODH) were retrieved from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using the protein Basic Local Alignment Search Tool (Altschul *et al.*, 1990). Nucleic acid sequences were imported in the software Mega (Tamura *et al.*, 2007), translated *in silico*, and the amino acid sequences were aligned using Muscle (Edgar, 2004). Alignments were manually refined and functional amino acid sequence motifs of the active site distinguishing *coxL* sequences belonging to type I-CODH (AYXCSFR) from type II-CODH (AYRGAGR) were examined in order to validate specificity of the retrieved sequences (King *et al.*, 2007). Phylogenetic tree of amino acid sequences translated from *coxL* gene sequences was constructed with maximum-likelihood algorithm. The alignment was used to identify consensus regions to design *coxL*-specific oligonucleotides. Three sets of degenerated primers were developed to detect and quantify

presumptive CO-oxidizers in soil, so-called universal-*coxL*, type I-*coxL* and δ -*Proteobacteria*-*coxL* assays (Table 4).

Table 4. List of the primers designed in this study

Assays (<i>coxL</i>)	Primers	PCR-amplified fragment size (bp)
Universal (PCR)	uni820-forward: 5'-GGBGGBGGYTTYGGCWMSAA-3' uni1611-reverse: 5'-GTBKCRGTGNCCCTGNCC-3'	800
Type I (qPCR)	type I-1288-forward: 5'-TSKKYACSGGCWSSTA-3' type I-1540-reverse: 5'-TAYGAYWSSGGYRAYTA-3'	252
δ - <i>Proteobacteria</i> (qPCR)	D967-forward: 5'-TTCTWCKCYGAYGCVCARCC-3' D1285-reverse: 5'-CBGAGTCGGDSASGAADCC-3'	291

16S rRNA gene sequences were retrieved from the genome of 102 presumptive CO-oxidizing bacteria identified in the *coxL* database (Table S1). 16S sequences were classified into two databases: type I-*coxL* and type II-*coxL* groups, as a function of *coxL* gene harbored by the bacteria, and then aligned. Nucleic acids pairwise difference (*D*) matrices were computed to obtain the identity scores *I* ($I = 1 - D$) of all possible combinations of 16S rRNA and *coxL* gene sequences for both databases. Comparisons between the percentages of identity of all *coxL* pairs and the sequence similarities of the 16S rRNA genes of the same bacteria were performed by regression analysis ($n = 820$ and $n = 1830$ for type I and type II databases, respectively). This pairwise identity score analysis has recently been utilized to establish an identity score threshold value for nitrate/nitrous oxide reductases (Palmer *et al.*, 2009), particulate methane monooxygenase (Degelmann *et al.*, 2010) and hydrogenase (Constant *et al.*, 2011b) gene sequences at the species level.

2.5.6 DNA extraction and universal-*coxL* PCR

Soil DNA was extracted from an exact amount of soil (~500 mg) using the FastDNA Spin Kit (MP Biomedicals®, OH, U.S.A.) for soil according to the manufacturers protocol. DNA was eluted in 50 μ L nuclease-free water. DNA samples were diluted (1:10, 1:100 and 1:500) before the PCR due to residual humic acids inhibition. All PCR mixtures consisted of 1X reaction buffer (15 mM MgCl₂), 0.2 mM deoxynucleotide triphosphates, 10 μ M of each primer (Table 4), 0.8 mg ml⁻¹ bovine serum albumin, 1.25 U Fast-*Taq* polymerase (Feldan®, QC, Canada), 2 μ L diluted DNA and nuclease-free water to obtain a final volume of 50 μ L. A touchdown PCR protocol was

used for the universal-*coxL* assay as follow: 95°C for 5 min, 16 cycles of “touchdown steps” denaturing at 95°C for 20 sec, annealing temperature starting at 65°C decreasing 0.5°C in every cycle to reach a temperature of 55° (40 sec at each cycle), and a elongation step of 72°C for 45 sec, completed with a final set of 19 regular PCR cycles of 95°C for 20 sec, 55°C for 40 sec and 72°C during 45 sec with a final extension of 72°C for 5 min.

2.5.7 *coxL* Gene libraries

One *coxL* gene library was derived from each sampling station, resulting in nine fully replicated libraries. Partial *coxL* gene sequences were PCR-amplified using the universal-*coxL* assay and cloned in pGEM-T® Easy Vector cloning Kit (Promega, WI, U.S.A.). Recombinant colonies were selected, plasmid DNA extracted following standard procedure (Sambrook *et al.*, 2001) and *coxL* inserts were PCR-amplified and sequenced using the Sanger’s Method (Génome Québec Innovation Centre, McGill University, QC, Canada). In total, 279 clones were obtained. Clone sequences were aligned and *in silico* translated to verify the canonical signature of the active site characterizing type I and type II *coxL* sequences. The OTU representative sequences (0.90 identity cut-off) obtained using the universal-*coxL* assay were deposited in the GenBank database with accession numbers KJ395119 to KJ395310. UniFrac distance matrix, reflecting the pairwise phylogenetic distance between the sequences retrieved from each sampling site was calculated to verify if land-use types have significantly different microbial communities (Lozupone *et al.*, 2005).

2.5.8 Type I- and δ -*Proteobacteria-coxL* qPCR assays

Type I- and δ -*Proteobacteria-coxL* genes were PCR-amplified using the universal-*coxL* assay and plasmid DNA of clone 55M3, derived from this study (accession number KJ395179) and genomic DNA of *Haliangium ochraceum* DSM 14365 as matrices, respectively. PCR products were concentrated and purified with standard commercial kits (E.Z.N.A. Cycle Pure Kit, Omega Bio-Tek®, GA, U.S.A.). Purified DNA was quantified with fluorescent DNA-binding dye (Quantifluor dsDNA, Promega, WI, U.S.A.). Standard curves for type I- and δ -*Proteobacteria-coxL* qPCR assays were obtained using serial dilutions of quantified DNA (10^1 to 10^9 copies μl^{-1}). Reactions contained 1X Perfecta SYBR Green Fast Mix reaction buffer (Quanta Biosciences®, MD, U.S.A.), 15 μM of each primer (Table 4), 0.3 mg ml^{-1} bovine serum albumin, 5 μL diluted DNA (1:500) and nuclease-free water to obtain a final volume of 20 μL . Preliminary

experiments with internal standard DNA spiked in soil DNA extracts (DeCoste *et al.*, 2011, Deer *et al.*, 2010) were conducted and showed undistinguishable qPCR-signal recovery between the samples using 1:500 DNA dilutions. Furthermore, qPCR results from 1:500 and 1:1000 dilutions were undistinguishable, providing no significant incidence of PCR inhibitors on *coxL* abundance data (data not shown). Reactions were performed in the Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science®, NSW, Australia) with the following conditions: 94°C for 5 min, 35 cycles of 94°C for 30 sec, 51°C (Type I-*coxL*) or 56°C (δ -*Proteobacteria-coxL*) for 30 sec, 68°C for 20 sec (Type I-*coxL*) or 15 sec (δ -*Proteobacteria-coxL*) with fluorescence acquisition following each 68°C step and a melting cycle with a ramp from 75°C to 99°C, rising 0.2°C every 5 sec. Replicate calibration curves were performed to verify the accuracy of the qPCR resulting in an efficiency of 0.70 ($R^2 = 0.98$) and 0.73 ($R^2 = 0.96$) for type I- and δ -*Proteobacteria-coxL* assays, respectively. Type I- and δ -*Proteobacteria-coxL* gene libraries were also performed to confirm the specificity of the assays. The resulting type I- and δ -*Proteobacteria-coxL* sequences with more than 200 pb length have been deposited in the GenBank database with accession numbers KJ567007 to KJ567022 and KJ567023 to KJ567040, respectively.

2.5.9 Statistical analysis

Gene libraries were normalized to the sequencing effort of the smallest *coxL* library to avoid biases in comparative analyses introduced by the sampling depth. Using the software Mothur (Schloss *et al.*, 2009), 24 *coxL* sequences were randomly selected from the nine libraries. The resulting sequences were grouped into operational taxonomic units (OTU) defined by an identity level of 0.90. These files were used for diversity index calculation and statistical analysis. Redundancy analysis (RDA) was computed using the Vegan package (Dixon, 2003) implemented in R (Team, 2008), according to the comprehensive procedure described by (Borcard *et al.*, 2011). RDA is a constrained analysis, used to extract structures of an observational dataset related to explanatory variables. In this study, RDA was considered to identify environmental variables influencing the structure of *coxL* gene profile in soil, in addition to highlight *coxL* sequences whose presence is related to elevated CO soil uptake activity. This test was preferred from canonical analysis due to the occurrence of several null values in the *coxL* data matrix. Soil variables (e.g. pH, carbon, nitrogen, water content, CO uptake activity) were standardized by subtracting individual values by the average and dividing them by the standard deviation. This transformation procedure resulted in centered data or z-scores, generating variables characterized by an average of zero and a standard deviation of 1. The

Hellinger transformation was applied to *coxL* OTU frequency distribution before computing the distance matrix to avoid undue relationships between explanatory variables and *coxL* composition supported by the high weight of rare species (Legendre *et al.*, 2001). The most parsimonious constrained model to explain *coxL* composition was obtained by forward selection of the environmental variables (Blanchet *et al.*, 2008) and permutation tests ($n = 1000$) were performed to assess the significance of the RDA. Pearson correlation analyses were conducted to identify environmental variables related to soil CO uptake activity. Analysis of variance with Bonferroni *post-hoc* statistical test was performed to compare CO uptake activity and abundance of *coxL* genes between the three land-use types (SigmaPlot 12[®], Systat Software Inc., CA, U.S.A.).

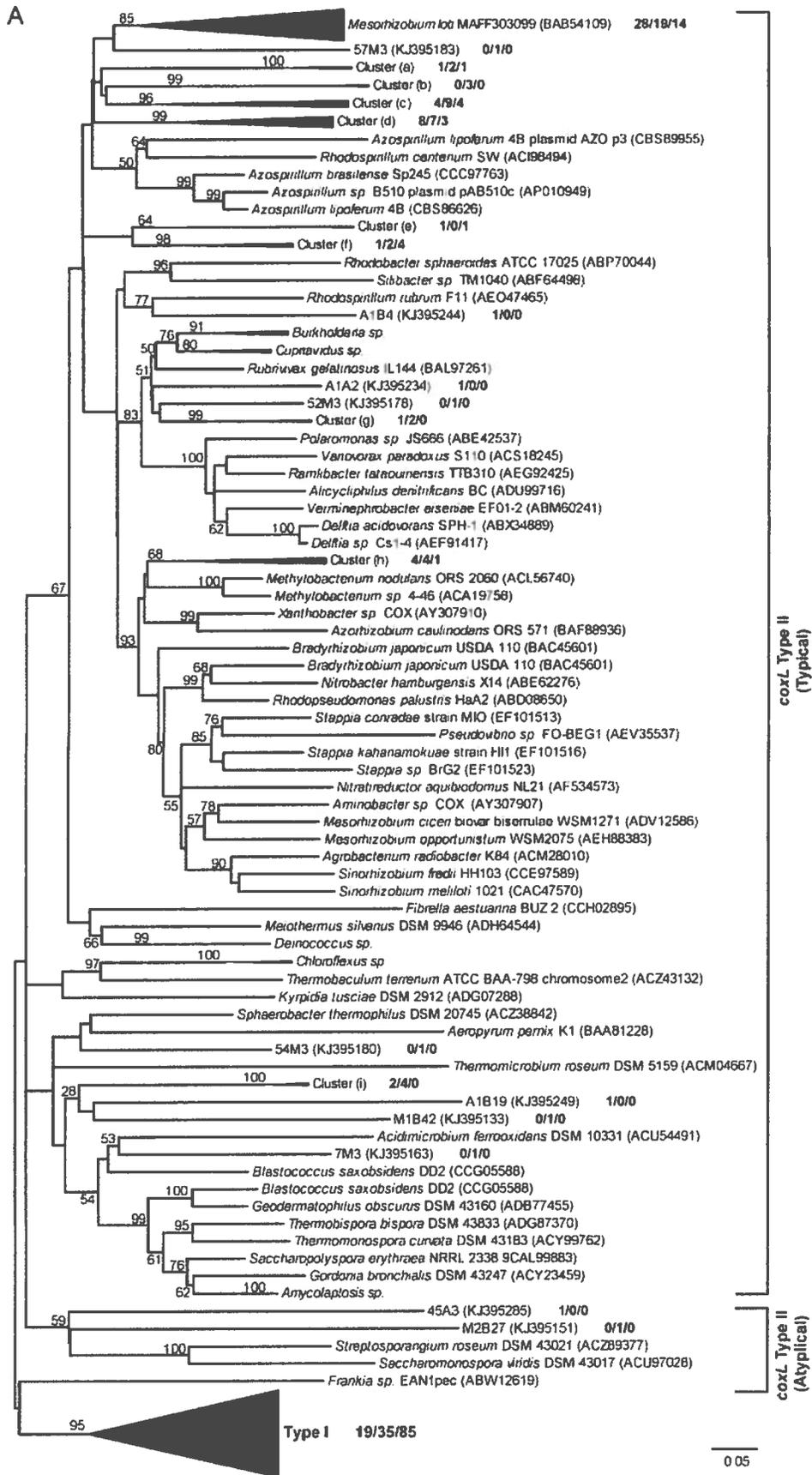
2.6 Results

2.6.1 Soil properties and CO uptake activity

Triplicate composite soil samples (A-horizon) were collected in April 2012 to relate CO uptake activity to soil physicochemical properties and *coxL* diversity profiles. The highest carbon and nitrogen contents were detected in deciduous forest soil, while maize monoculture showed the maximum levels of potassium and phosphorus (Table 1). Distribution of the measured variables showed some level of co-linearity. Indeed, soil water content was positively related to K, P and pH (Pearson correlation, $P < 0.05$) and inversely related to total carbon and nitrogen content (Pearson correlation, $P < 0.01$). Variations in soil physicochemical properties resulted in a broad range of CO uptake activities, from $45 \text{ pmol g}^{-1}_{(\text{d.w.})} \text{ h}^{-1}$ in larch plantation (station M2) to $3243 \text{ pmol g}^{-1}_{(\text{d.w.})} \text{ h}^{-1}$ in deciduous forest (station F3). The activity was positively correlated to carbon and nitrogen content in soil (Pearson correlation, $P < 0.01$), whereas no significant relationship was observed with the other variables. In accordance with total carbon and nitrogen profiles, CO uptake activity observed in deciduous forest soil was greater than in maize and larch plantations (ANOVA, $P < 0.05$), while soil samples collected from these two sites could not be distinguished based on their CO uptake activity. CO compensation concentration, reached when CO production and consumption rates are equivalent, was at the detection limit of the gas chromatographic system for the three ecosystem types (*i.e.* $< 25 \text{ ppbv}$), impairing estimation of the gross production and consumption rates of CO (Conrad, 1994).

2.6.2 Detection of *coxL* gene sequences

An extensive phylogenetic analysis of *coxL* gene sequences was essential to get fundamental information regarding the evolution of functional type I-CODH and hypothetical type II-CODH, to optimize the universal-*coxL* PCR detection assay as well as to interpret and comment on clone libraries data. Putative *coxL* gene sequences were obtained from genome sequencing projects of CO-oxidizing bacteria showing high affinity CO uptake activity (Figure 7). A parsimonious phylogenetic reconstruction of the type I-CODH group was obtained, while type II-*coxL* sequences were distributed in several clusters for which topology was poorly supported by bootstrap analysis (Figure 7A). Inspection of the conserved amino acid signature of the active site unveiled the occurrence of atypical motif in *Saccharomonospora viridis* and *Streptosporangium roseum* (Figure 7A).



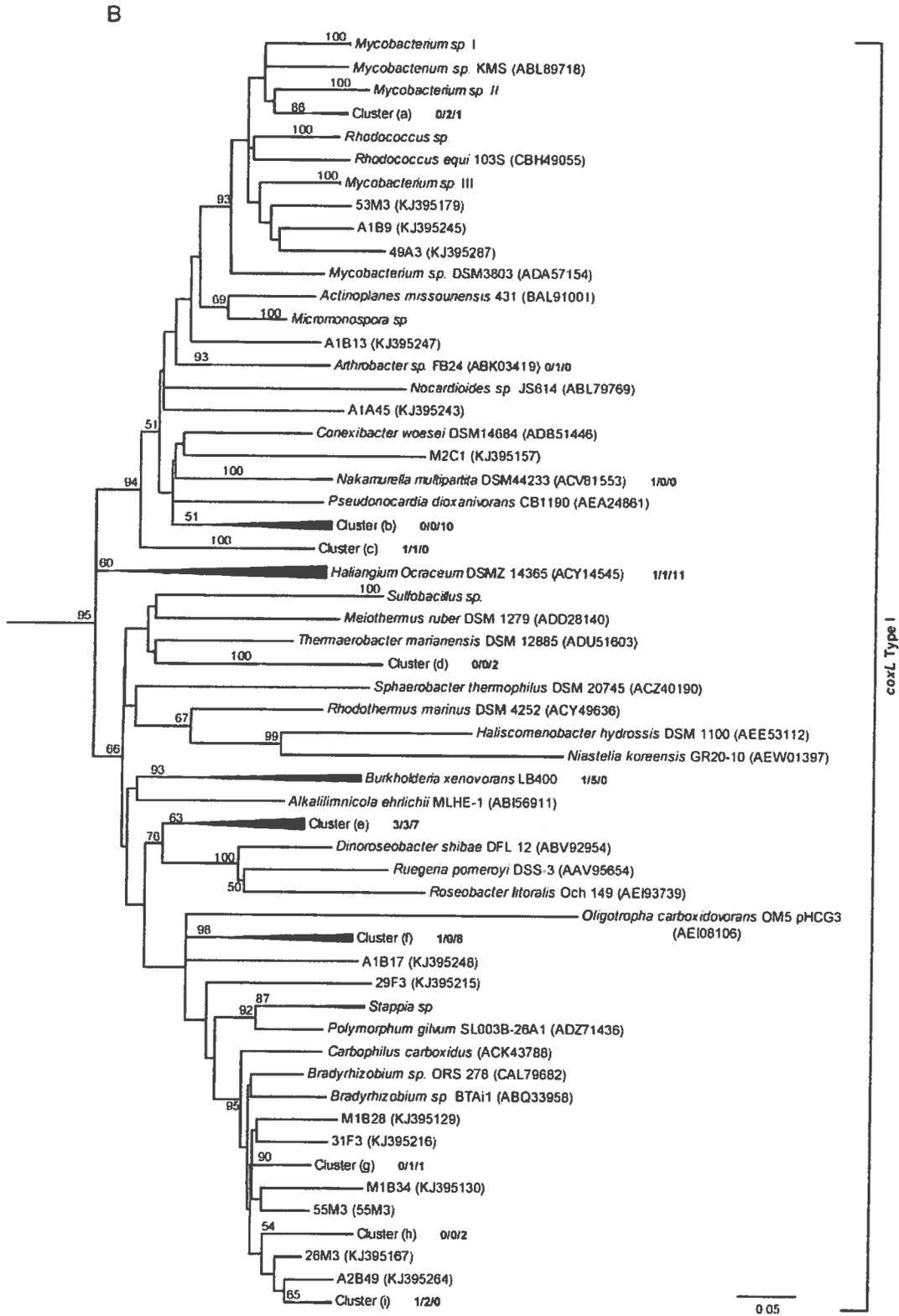


Figure 7. Phylogenetic analysis of *coxL*-inferred amino acid sequences (313 residues) by the maximum-likelihood algorithm [model WAG+G]. Global analysis including both type I- and type II-*coxL* sequences is shown (A) with a

detailed view of *coxL*-type I phylogenetic group (B). The analysis included sequences retrieved from public database along with the 192 OTUs identified in this study. The numbers in brackets show the number of *coxL* sequences from the nine clone libraries belonging to individual OTUs and clusters [maize/larch/deciduous]. The percentage of replicated trees in which the associated *CoxL* sequences clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown for nodes supported by $\geq 50\%$ of the replicates. Prefixes of OTUs encompassing type I- and type II-*coxL* indicate land-use type as follow: A, maize monoculture; M, larch monoculture and F, deciduous forest. Scale = number of substitutions per site.

The PYRGAGR signature observed in these bacteria diverged from the canonical AYRGAGR motif of type II sequences. Pairwise sequence identity scores of 16S rRNA and *coxL* genes were calculated to test whether standardization of the classification of *coxL* sequences is possible under “species-level” operational taxonomic units (OTU) and to assign environmental *coxL* sequences to taxonomic groups in phylogenetic analyses. The pairwise sequence identity scores were correlated in bacteria possessing type I-*coxL* sequence, where the linear regression model ($n = 820$, $P < 0.001$) predicts a species-level identity score threshold of 0.89 ± 0.04 (Figure 8A). For type II sequences, the regression model ($n = 1830$, $P < 0.001$) was associated to a species-level identity score threshold of 1 ± 0.07 (Figure 8B), providing indication for different evolution histories for both types of CODH. Evidence of lateral transfer was noticed for type II-CODH. For instance, type II-*coxL* sequence detected in the aerobic hyperthermophilic Crenarchaeota *Aeropyrum pernix* was affiliated with that of a member of the Chloroflexi phylum (*Sphaerobacter thermophilus*), supporting potential lateral gene transfer event in the Archaea (Figure 7A). The extensive *coxL* database was utilized to optimize the universal *coxL* PCR detection assay developed by (King, 2003a). An important feature of the assay is the inclusion of the conserved signature of the active site in the targeted region, facilitating quality control and classification of the sequences. Consensus degenerated oligonucleotides were modified to maximize coverage of the universal assay (Table S2).

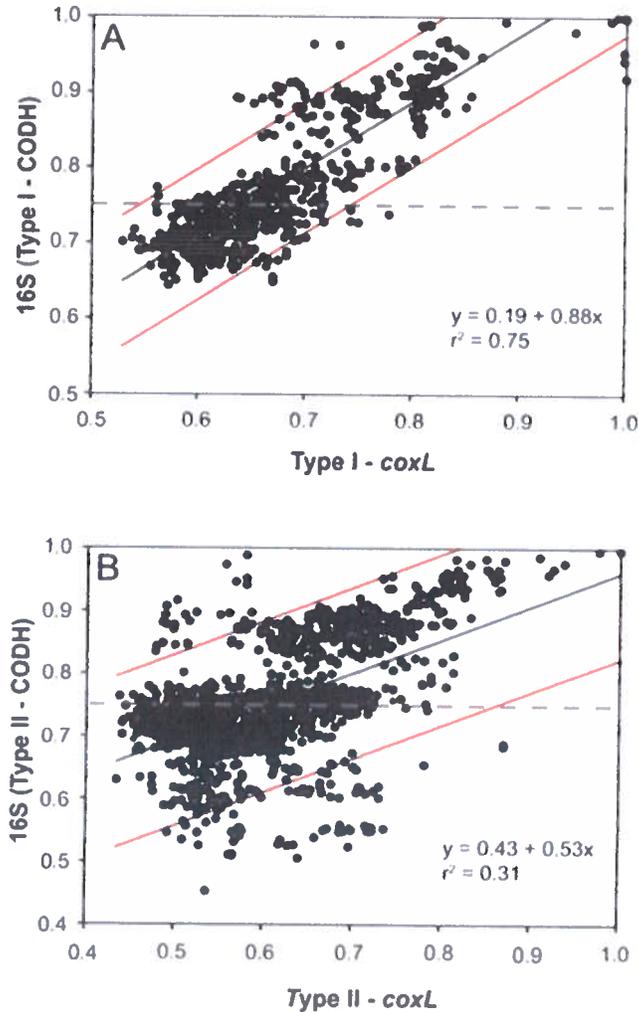


Figure 8. Correlation between the pairwise sequence identity scores of *coxL* and the 16S rRNA gene in presumptive CO-oxidizing bacteria belonging to (A) type I-CODH and (B) type II-CODH. The black line represents the linear regression and red lines delineate the prediction interval of the model for the 95% confidence level.

Genomic DNA was extracted from nine composite soil samples and *coxL* genes were PCR-amplified, cloned and sequenced. In total, 279 clones were derived from the maize (73), larch (93) and deciduous forest (113) samples. Sequences were classified into 192 different OTU using an arbitrary cut-off of 10% difference to accommodate both type I- and type II-*coxL* sequences. According to a rarefaction analysis, sampling effort was insufficient to cover the whole diversity of presumptive CO-oxidizing bacteria communities (data not shown). Comparison of the clone libraries thus are representative of the dominant members of this functional group in soil. Diversity metrics indicate lower richness of *coxL* sequences sampled in

deciduous forest soil than the monocultures (Table 5). The lower value of the Simpson index in deciduous forest reflects dominance of the sampled community by a small number of OTU. UniFrac analysis of the nine clone libraries was in accordance with the diversity metrics.

Table 5. Physicochemical properties, potential CO uptake activity and *coxL* richness in soil. Average values (3 sampling stations per land-use type) are represented with standard deviations.

Land-use type	Texture (Sand/Silt/Clay)	C (%)	N (%)	P (mg kg ⁻¹)	K (mg kg ⁻¹)	pH	H ₂ O (%)	CO (pmol g _(dry) ⁻¹ h ⁻¹)	Simpson (D)	Shannon (H')	# of <i>coxL</i> clones
Maize	0.05/0.84/0.11	1.6 ±0.2	0.09 ±0.04	616 ±24	471±186	5.4 ±0.4	17 ±6	389 ± 52	0.01	4.0	24±3
Larch	0.03/0.88/0.09	2.3 ±0.2	0.14 ±0.01	332 ±17	382 ±115	4.7 ±0.2	38 ±10	227 ±221	0.01	4.0	31±7
Deciduous	0.14/0.84/0.02	11 ±4	0.59 ±0.23	290 ±95	174 ± 78	4.0 ±0.3	59 ±4	1962 ± 1117	0.03	3.4	37±8

Composition of deciduous forest clone libraries differed significantly from maize and larch monocultures, while conversion of the agricultural field to larch monoculture 15 years ago did not influence the composition of dominant presumptive CO-oxidizing bacteria (Figure 9).

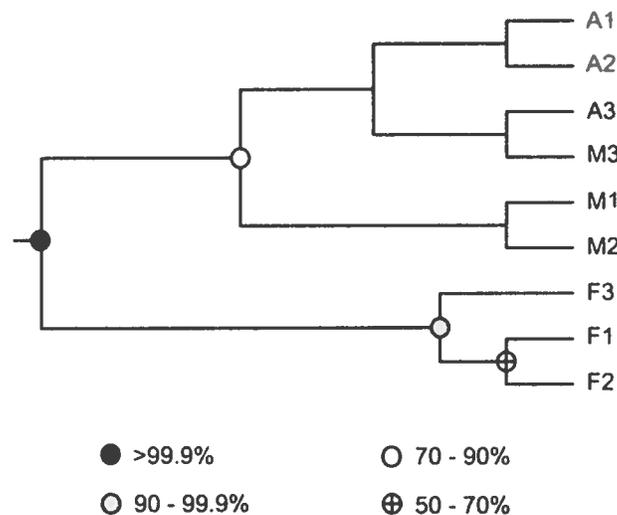


Figure 9. UPGMA dendrogram of soil samples collected in deciduous forest (stations F1, F2, F3), maize monoculture (stations A1, A2, A3) and larch plantation (stations M1, M2, M3). The UPGMA was derived from the UniFrac distance matrix, reflecting the pairwise phylogenetic distance between the sequences retrieved from each sampling stations. Nodes are filled as a function of the frequency at which they were found in Jackknife procedure keeping 75% sequences for the analysis.

The relative abundance of clones belonging to types I and II varied as a function of land-use type (Figure 10A). Type I-*coxL* sequences dominated deciduous forest soil, while maize and larch plantations displayed higher proportion of type II. Clone sequences belonging to type II were phylogenetically-distant from cultured representative bacteria. With the exception of the OTU A2B46, affiliated to *coxL* sequence from *Mesorhizobium loti* (73% identity score, implying both sequences are derived from bacteria that could belong to two different phyla; Figure 8B), no type II sequence related to clusters comprising known CO-oxidizing bacteria was detected (Figure 7A). Phylotypes affiliated to the atypical *coxL* sequence of *S. viridis* and *S. roseum* were detected in the three ecosystem types, representing 0.7% of the analysed clones. Most of the clones encompassing type I-*coxL* were comprised in *Actinobacteria* (16%), *α-Proteobacteria* (14%) and *δ-Proteobacteria* (10%) clusters. The proportion of clone sequences related to these phyla varied as a function of land-use type. For instance, 27% type I sequences detected in deciduous forest encompassed the *δ-Proteobacteria* cluster, while this group represented 6 and 10% in maize and larch monocultures (Figure 10B).

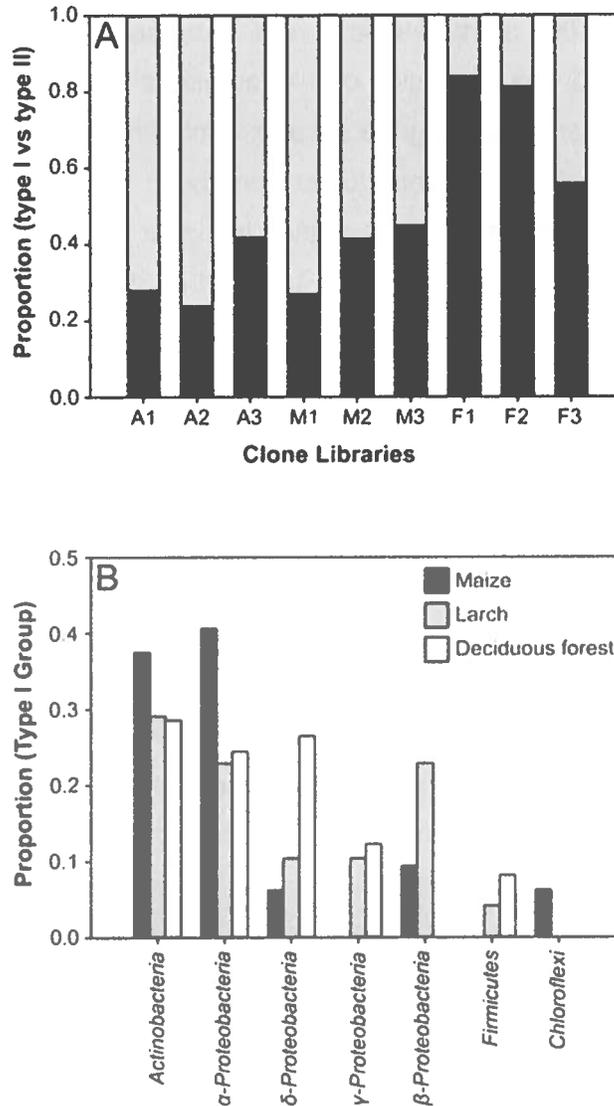


Figure 10. (A) Relative abundance of *coxL* clone sequences belonging to type I- (black) and type II-CODH (grey) groups in the nine clone libraries. (B) Percent composition (average \pm standard error of three replicated clone libraries) of bacterial phyla represented by type I-*coxL* sequences detected in the three different ecosystems.

2.6.3 Relationship between *coxL* gene sequences and environmental variables

A redundancy analysis was performed to infer the relationship of *coxL* gene sequences with environmental variables (Figure 11). The most parsimonious model to explain variation of *coxL* sequences included soil CO uptake activity and water content. The other variables being redundant to CO uptake and soil moisture, their addition in the analysis increased the variance inflation factor unduly and they were therefore ignored in the analysis. The first two canonical

axes explained 38% of the total variance of *coxL* OTU frequency distribution. Significance of the RDA was confirmed with 1000 permutations of *coxL* data matrix ($P = 0.003$). Soil water content played an important role for the dispersion of the samples along the first axis, while CO uptake activity discriminated the samples along the second. According to UniFrac analysis, axes clearly separated samples collected in deciduous forest from those originating from both monocultures (Figure 11). The occurrence of 12 OTU was related to higher CO uptake activities. Among them, 10 encompassed type I phylogenetic group (F162, F187, 3F3 F2A71, M2C2, M1A14, F1A13, F2B13, F171, F2A72), while 2 belonged to type II (32F3, F174). Combined with the higher relative abundance of type I sequences detected in deciduous forest, this observation led us to consider that type I-*coxL* might be a better indicator of CO uptake activity in soil than type II sequences. OTUs F162 and F187 were related to deciduous forest samples characterized with the highest CO uptake activity (Figure 11). These sequences encompass the δ -*Proteobacteria* cluster, suggesting the relevance of this type I-*coxL* subgroup to predict CO oxidation activity in the soil samples. The obligate halophile myxobacterium *Haliangium ochraceum* isolated from coastal seaweed (Fudou *et al.*, 2002) was the sole cultivated representative of the δ -*Proteobacteria* cluster, with no report on its CO uptake activity. We tested the CO uptake activity of *H. ochraceum* and confirmed its capability to scavenge atmospheric CO (Fig. S1). This is the first demonstration of CO oxidation activity in the δ -*Proteobacteria* class.

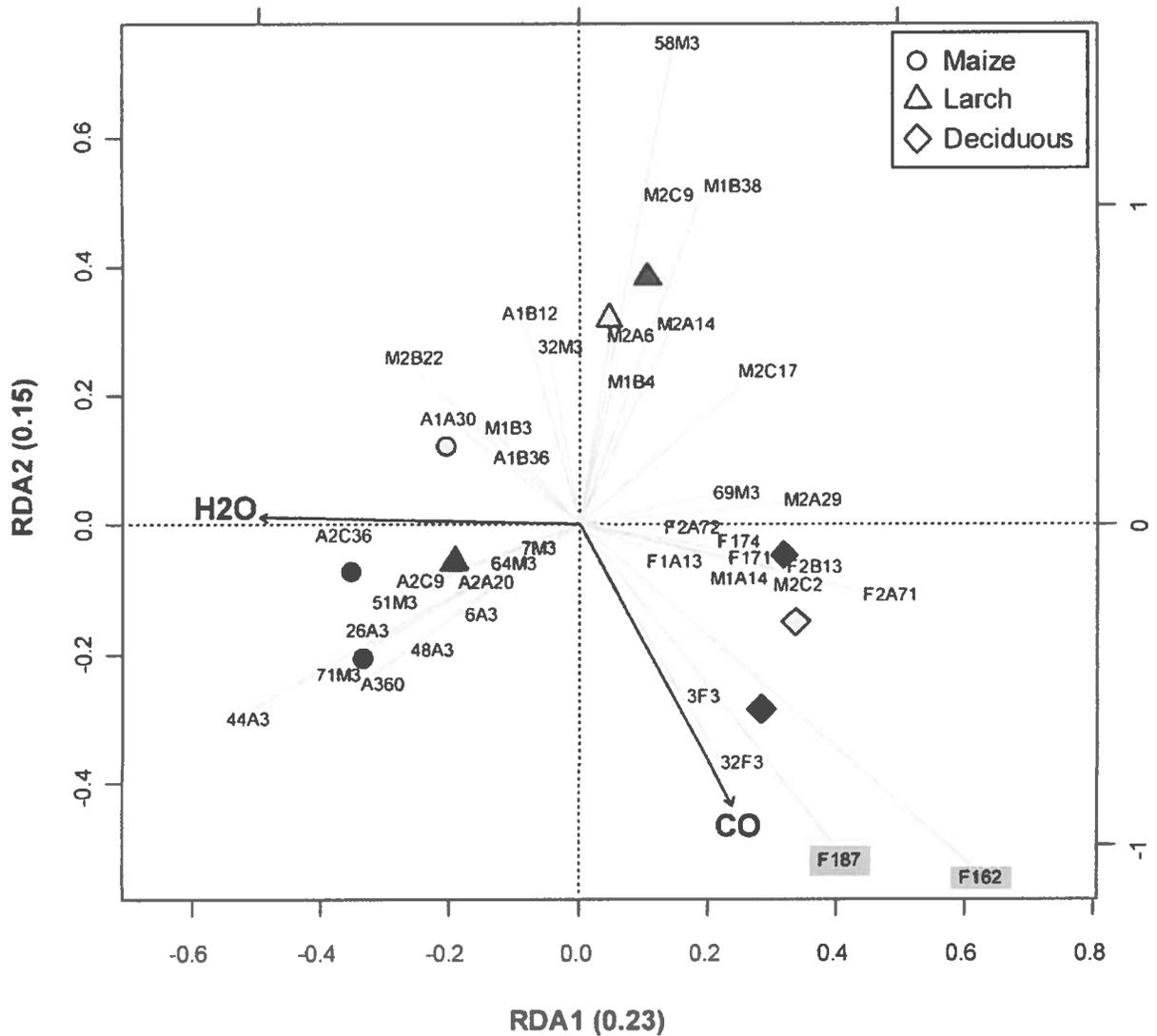


Figure 11. Parsimonious RDA triplot of Hellinger-transformed *coxL* OTU frequency matrix explained by soil water content and CO uptake activity. One OTU representative was kept for the analysis in the case of collinearity in *coxL* OTU profiles.

2.6.4 Linking CO uptake activity to the abundance of *coxL* sequences and theoretical populations of carboxydovores bacteria in soil

Gene libraries suggested that distribution of *coxL* sequences belonging to type I or the δ -*Proteobacteria* cluster reflect CO soil uptake activity. The analysis was however limited by insufficient sampling effort to cover the whole diversity of *coxL* sequences in soil as well as PCR

and cloning bias. In order to challenge the results of clone libraries, the three sampling sites were visited for a second soil survey in 2013. CO uptake activity was measured and showed the same trend than the 2012 soil survey, with higher oxidation rates in deciduous forest than in monocultures, and total DNA was extracted for qPCR analyses. Degenerated oligonucleotides were designed to quantify *coxL* sequences belonging to type I group and δ -*Proteobacteria* subgroup. Optimization of a broad assay, specific type I-*coxL* sequences derived from public database and clone sequences obtained in this study was unsuccessful due to no or unspecific amplification signals induced by consensus degenerated primers (data not shown). As an alternative, oligonucleotides were designed based on the clone sequences only. Specificity of the assays was confirmed by *coxL* gene libraries (23 clones per assay) with 13 and 0% unspecific sequences for type I and δ -*Proteobacteria*, respectively. The abundance of type I-*coxL* varied between 10^9 - 10^{10} genes $g_{(dw)}^{-1}$ in maize and larch monocultures and 10^{10} - 10^{11} genes $g_{(dw)}^{-1}$ in deciduous forest (Figure 12A). A similar trend was observed for the δ -*Proteobacteria* subgroup with an average of 10^9 and 10^{11} genes $g_{(dw)}^{-1}$ for monocultures and deciduous forest, respectively (Figure 12A). According to *coxL* gene libraries, type I-*coxL* sequences were more abundant in deciduous forest soil than both monocultures ($P = 0.004$). The abundance of δ -*Proteobacteria* *coxL* sequences and the relative proportion of this group was significantly higher in deciduous forest than maize monoculture ($P = 0.01$), while maize and larch monocultures pair as well as larch plantation and deciduous forest pair could not be distinguished based on the abundance of δ -*Proteobacteria* *coxL* sequences. Linear regression analyses showed that abundance of both *coxL* subgroups, as estimated by qPCR, was proportional to CO oxidation activity in soil ($P < 0.003$), but the relationships were largely driven by the contrasting properties of of deciduous forest samples (Figure 13).

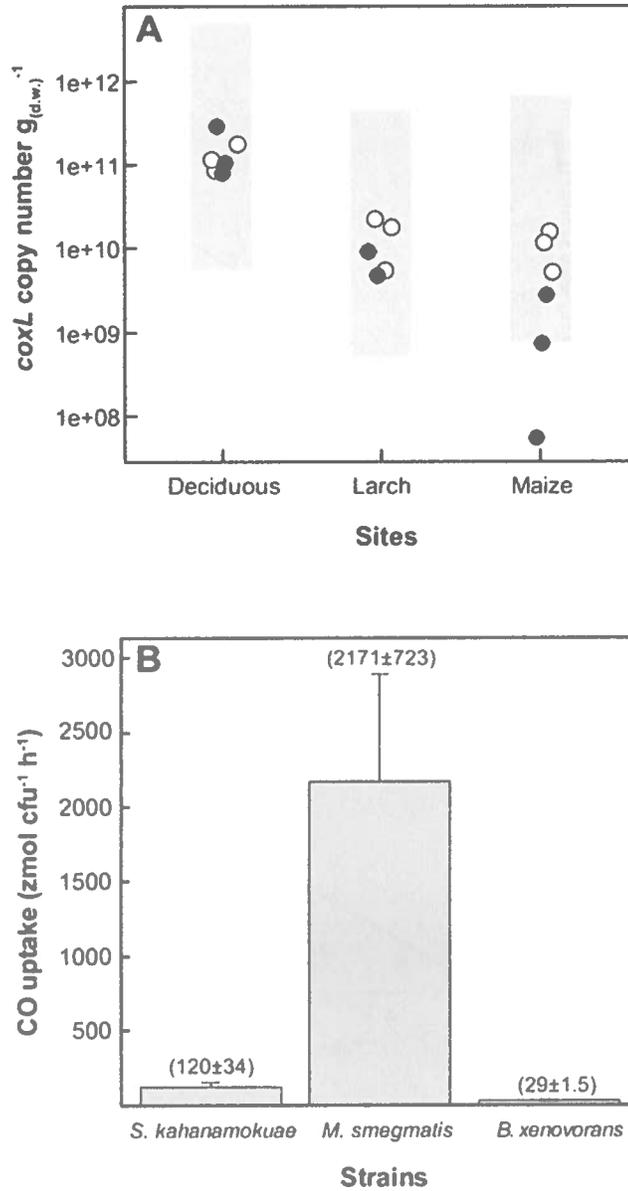


Figure 12. (A) Abundance of type I-coxL sequences (○) and δ -Proteobacteria-coxL sequences (●) in soil. Shaded areas represent the lower and upper limit of theoretical populations of CO-oxidizing bacteria. Average CO uptake rates measured in soil samples collected in 2013 (1.5, 1.0 and 11 $\text{nmol } g_{(d.w.)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ for maize, larch and deciduous forest respectively) and cell-specific activity of *B. xenovorans* (upper limit of the population) and *M. smegmatis* (lower limit of the population) were used for the calculations (see panel B). (B) Specific CO uptake activity of selected CO-oxidizing bacteria.

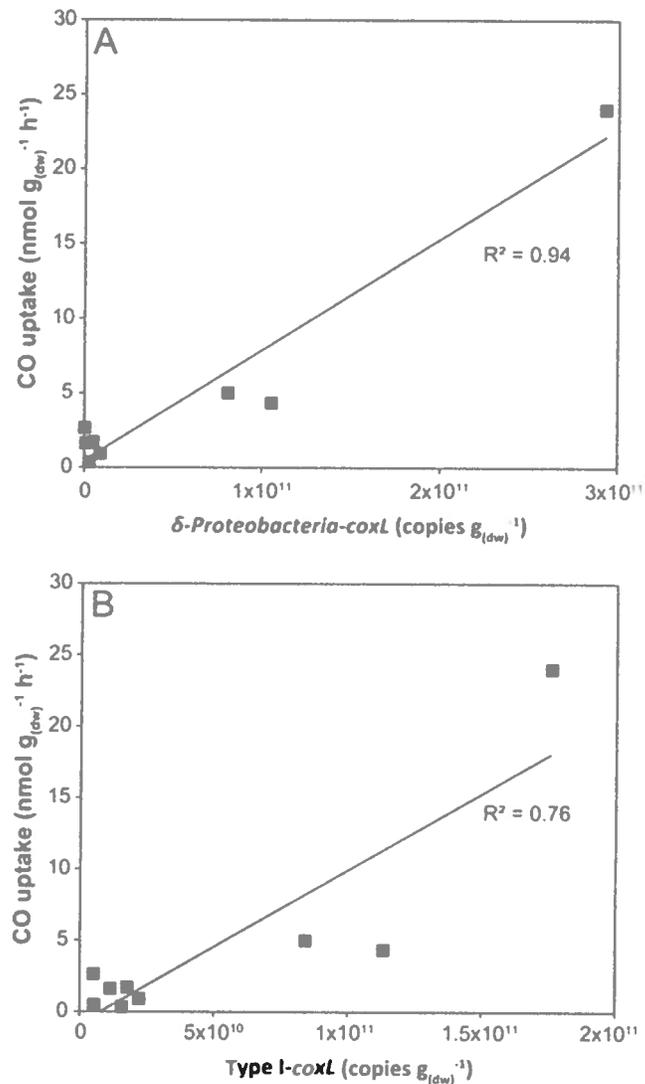


Figure 13. Linear regression modelling dependence of CO uptake activity on the abundance of (A) δ -Proteobacteria-coxL and (B) type I-coxL copy number in soil assessed by qPCR.

2.6.5. Theoretical populations of carboxydovore bacteria in soil

Although differences in the efficiency of the qPCR reaction between standard and environmental DNA templates are expected due to the utilization of degenerated primers, the absolute quantification method remains a standard choice in environmental microbiology (Brankatschk *et al.*, 2012). In order to verify the reliability of the qPCR estimates, three carboxydovore bacteria known to oxidize atmospheric CO and available in public microorganism culture collections were selected and characterized in term of cell-specific CO uptake activity. CO oxidation activity was detected at the onset of the stationary phase of the strains

demonstrating a broad range in specific activities, from 29 to 2171 $\text{z mol cfu}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Figure 12B). This range in specific activities was used to calculate theoretical populations (N ; $\text{cell g}_{(\text{dw})}^{-1}$) of metabolically active carboxydovore bacteria necessary to explain the CO uptake activity measured in the second soil survey (eq. 1):

$$N = \frac{CO_{\text{Soil}}}{CO_{\text{Bacteria}}} \quad (\text{eq. 1})$$

where CO_{Soil} is the CO uptake activity measured in soil ($\text{pmol g}_{(\text{dw})}^{-1} \text{ h}^{-1}$) and CO_{Bacteria} is the CO oxidation rate in carboxydovore bacteria ($\text{pmol cfu}^{-1} \text{ h}^{-1}$; cfu = colony forming unit). The lowest and highest cell-specific CO oxidation activities (CO_{Bacteria}) measured in *Burkholderia xenovorans* and *Mycobacterium smegmatis* (Figure 12B) were utilized to calculate the upper and lower limits of N , respectively (Figure 12A, shaded areas). For this calculation, it is assumed that each bacterium harbors a single *coxL* operon and that one cfu corresponds to a unique viable cell. Considering the facts that some bacteria possess two *coxL* operons and the possibility that bacterial colonies arise from cell aggregates, this calculation provided a rough estimate of theoretical carboxydovore populations in soil. Nevertheless, with the exception of the abundance of δ -*Proteobacteria coxL* sequences in maize monoculture where qPCR data were below theoretical estimates, there was an agreement between theoretical populations and qPCR data (Figure 12A).

2.7 Discussion

Land-use change exerts strong impact on biogeochemical cycles and soil microbial communities. These environmental pressures are especially marked for biogeochemical processes involving specific metabolisms, restricted to specialist microbes. For instance, afforestation of bog and grassland altered methanotrophic bacteria communities structure in soil, which was directly linked to an enhanced atmospheric methane soil uptake activity in land management experimental stations (Nazaries *et al.*, 2013). Similarly, composition of N_2 -fixing and denitrifying microbial communities responded to soil physicochemical properties and land-use change, resulting in alteration of nitrous oxide fluxes following afforestation of pastures (Singh *et al.*, 2011). The impact of land-use change on CO soil-to-air exchanges has been investigated in tropical and temperate climates. Exchanges measured in the field being

influenced by temperature and soil water content, these investigations resulted in conflicting observations where agricultural areas represented either more important (King, 2000, King *et al.*, 2002, Pendall *et al.*, 2010) or less important (Moxley *et al.*, 1998b) sinks for atmospheric CO than native forests. An unanswered question is whether variance of CO uptake rates observed in soil was due to change in CO-oxidizing bacteria populations in term of density, specific activity or diversity. Very few field studies combined CO uptake rate measurements with molecular survey of CO-oxidizing bacteria, impairing a clear assessment of the environmental control on their distribution and activity. One notable exception is an extensive survey of CO-oxidizing bacteria accomplished along volcanic deposits, demonstrating a gradient in community structure parallels to CO uptake activity (Weber *et al.*, 2010a). Here, we seek to examine the occurrence of such microbial succession in three neighboring land-use types. The sampling strategy as well as replication of *coxL* gene libraries and physicochemical analyses were essential to assess the spatial distribution of CO-oxidizing bacteria in the surveyed ecosystems with confidence, in addition to identify the environmental factors best explaining their distribution (Prosser, 2010).

Although conversion of the maize plantation to larch monoculture 15 years ago resulted in significant changes in soil physicochemical properties (Table 5), it exerted no significant impact on CO uptake activity and *coxL* diversity. However, higher activity and distinct CO-oxidizing bacteria community structure were observed in deciduous forest soil, which emerged from fallow land without human intervention. CO uptake rates reported in Table 1 were in the same magnitude than the $0.3\text{-}50 \text{ nmol g}_{(\text{dw})}^{-1} \text{ h}^{-1}$ observed in temperate forest soil samples exposed to atmospheric CO (Hardy *et al.*, 2001a, King, 1999b). Soil carbon and nitrogen content were the best variables to explain variations of CO uptake activity. Even though such relationships have been observed in previous investigations, the mechanistic aspects of the simulation of CO uptake activity by soil nutrients have received little attention. In the case of nitrogen, correlation does not imply causation since previous investigations excluded nitrogen limitation of the activity. Indeed, ammonium soil amendments caused no influence on CO uptake rate, while nitrite addition resulted in transient inhibition of the activity (Chan *et al.*, 2006, King, 1999b). On the other hand, two main mechanisms have been proposed to explain how soil carbon content enhances CO uptake activity. Considering the fact that soil carbon content determines microbial biomass and soil respiration activity, it was first proposed that higher soil carbon content supported more abundant communities of CO-oxidizing bacteria (Inman *et al.*, 1971, King, 1999b, Moxley *et al.*, 1998b). Secondly, an increase of the relative importance of *coxL* OTU to 16S rRNA gene OTU ratio as a function of soil organic carbon has been noticed, suggesting that soil carbon enhances diversity of CO-oxidizing bacteria relative to the whole

microbial population in soil, resulting in an alteration in CO uptake activity (Weber *et al.*, 2010a). Variation of the abundance and community structure of CO-oxidizing bacteria in response to carbon content in soil are likely induced by the occurrence of a larger pool of CO in organic rich soils, due to abiotic CO production reactions resulting from thermal- and UV irradiation-mediated soil organic matter decomposition (Conrad *et al.*, 1985, Derendorp *et al.*, 2011, Sanhueza *et al.*, 1998). Therefore, considering that low pH and high carbon content are known to promote CO production in soil (King, 1999b, Moxley *et al.*, 1998b), sampled deciduous forest may represent a more favorable niche for CO-oxidizing bacteria relative to maize and larch monocultures, resulting in the distribution of *coxL* sequences and CO uptake activities measured in this study.

The occurrence of *coxL* gene sequences belonging to type I and type II groups has been documented in forest, agricultural soils and volcanic deposits. Investigations undertaken in volcanic deposits showed that type I-*coxL* diversity was correlated to soil respiration and CO uptake activity, while no significant correlation was found for type II-*coxL* sequences (Dunfield *et al.*, 2005). This observation suggested that microbes belonging to type I and type II groups responded differently to environmental factors. Our analysis extends this proposal and unveils that type I-*coxL* sequences are better proxy for soil CO uptake activity than those encompassing the type II clade. The relative proportion of type I sequences was higher in deciduous forest soil demonstrating the highest CO uptake activity (Figure 10A), while maize and larch monocultures comprised higher proportion of *coxL* sequences belonging to type II-CODH. This was further supported by the qPCR assay, showing a direct link between type I-*coxL* gene number and CO uptake activity (Figure 13B). These observations, combined with experimental evidence obtained in previous investigations, question the physiological role of the hypothetical type II-CODH in bacteria and the relevance of this genetic marker for CO uptake activity. In contrast to type I-CODH, functional type II-CODH remains to be experimentally demonstrated. The best characterized type I-CODH is the enzyme from *Oligotropha carboxidovorans*, a carboxydophilic bacterium unable to oxidize atmospheric CO due to its low affinity for this substrate (Conrad *et al.*, 1981). Nevertheless, this classical CODH model unveiled critical features on genetic regulation and architecture of the active site (Dobbek *et al.*, 2002, Santiago *et al.*, 1999). Functional type II-CODH was proposed following the PCR-detection of type II *coxL* (and no detection of type I-*coxL*) in *Aminobacter* sp. COX, demonstrating high affinity CO-uptake activity (King, 2003a). The involvement of type II-CODH in CO oxidation reaction is however puzzling since the canonical cysteine residue accommodating the copper atom directly involved in the CO oxidation catalysis (Dobbek *et al.*, 2002) is replaced by a glycine residue in these hypothetical enzymes. Furthermore, characterization of CO oxidation activity in marine

Roseobacter spp. revealed that strains harboring type II-*coxL* only were not active (Cunliffe, 2010). Genetic investigations are mandatory to assess the physiological role of type II-CODH, but *coxL* sequences belonging to functional type I-CODH phylogenetic group appear more relevant to predict CO uptake activity in soil.

Previous soil survey for CO-oxidizing bacteria realized along volcanic deposits, agricultural areas and forests unveiled dominance of type I-*coxL* sequences belonging to α -, β -*Proteobacteria*, *Actinobacteria* and *Chloroflexi*, with each group represented by strains for which CO uptake activity has been demonstrated (King *et al.*, 2007). The α -*Proteobacteria* cluster comprises the model CO-oxidizing bacterium *Oligotropha carboxidovorans* able to grow using CO as only carbon source, as well as *Bradyrhizobium*, *Roseobacter*, *Ruegeria* and *Stappia* representatives. Among these, *Stappia* isolates displayed a high affinity CO oxidation activity and thus, the ability to oxidize ambient and sub-ambient levels of CO (Weber *et al.*, 2007a). *Bradyrhizobium*, *Roseobacter* and *Ruegeria* representatives were also shown to oxidize CO, but their affinity for CO has not been reported (Cunliffe, 2010, King, 2003a, Tolli *et al.*, 2006). Oxidation of atmospheric CO in β -*Proteobacteria* mainly has been examined in *Burkholderia*. Metabolism of CO was unevenly distributed in this genus, with more prevalence in strains thriving in the rhizosphere, and CO oxidation rates were shown to be higher when heterotrophic growth substrates were limiting (King, 2003a, Weber *et al.*, 2011). *Actinobacteria* were also shown to oxidize atmospheric CO, with mycobacterium as the most extensively studied group (Kim *et al.*, 2012b, King, 2003c, Song *et al.*, 2010). Finally, recent investigations demonstrated that capacity for CO uptake is a common trait among the *Ktedonobacteria*, in agreement with the detection of *coxL* sequence affiliated to this taxonomic group in cinder volcanic deposits (King *et al.*, 2014, Weber *et al.*, 2010a). These observations suggest that carboxydovore bacteria responsible for the measured CO uptake activity harbored the type I-*coxL* sequences detected in this study. Comparison of our analysis with previous investigations combining type I-*coxL* and CO uptake activity analysis suggests that environmental conditions select different groups of carboxydovores in soil. Indeed, analysis of a vegetation chronosequence in Hawaii highlighted an increase in β -*Proteobacteria-coxL* sequences in sites characterized by higher CO uptake activity, suggesting the importance of this taxonomic group for CO uptake activity (King *et al.*, 2014, Weber *et al.*, 2010a, Weber *et al.*, 2010b). It was proposed that CO-oxidizing *Burkholderia* spp. were favored with plant development, benefiting of root exudates for growth and elevated CO levels as energy source in the rhizosphere (King *et al.*, 2002a, Weber *et al.*, 2011). In this study, assignation of type I-*coxL* clone sequences to taxonomic groups showed a higher relative abundance of δ -*Proteobacteria-coxL* sequences in deciduous forest showing the maximal CO

uptake activity (Figure 10B). Rare sequences affiliated to this cluster were detected in bare soil of volcanic deposits, with *H. ochraceum* as the closest cultivated relative (Weber *et al.*, 2010a). We confirmed the ability of *H. ochraceum* to oxidize atmospheric CO, but the origin of detected δ -*Proteobacteria-coxL* sequences remains unknown as they share less than 75% identity score with *H. ochraceum*. Although this carboxydovore is halophile, myxobacteria related to this genus are diverse and were detected in recent soil metagenomic surveys (Luo *et al.*, 2014, Zhou *et al.*, 2014). Myxobacteria are ubiquitous in soil and are characterized by the formation of fruiting bodies enclosing stress-resistant myxospores structures as well as their ability to metabolise recalcitrant carbon macromolecules and feed on prey microorganisms through exoenzyme secretion (Dawid, 2000, Reichenbach, 1999). As no other genome sequence of δ -*Proteobacteria* was shown to harbor *coxL* gene sequence in our genome data mining, isolation of more representatives within this taxonomic group deserves peculiar attention to investigate their contribution in the biogeochemical cycle of CO.

This article provides the first absolute abundance of type I-*coxL* sequences in soil. The abundance of type I sequences determined in this study was higher than the 10^8 genes g^{-1} reported in volcanic deposits using a qPCR assay specific to *Burkholderia* (Weber *et al.*, 2010b). Analysis of cell-specific CO oxidation activity in three selected carboxydovores was undertaken to assess reliability of the qPCR assays. There was a general agreement with the *coxL* gene numbers and theoretical populations of carboxydovores bacteria necessary to explain the CO uptake activity measured in soil. The broad range in theoretical population predictions was explained by variance in specific CO oxidation activities, varying from 29 to 2171 $zmol\ cfu^{-1}\ h^{-1}$ among the tested isolates. Even though potential variability induced by the formation of cfu from cell aggregates cannot be excluded, similar variations were observed in previous comparison of CO uptake activity in carboxydovore bacteria. Indeed, activity measured in axenic cultures of *Stappia* sp. and *Stenotrophomonas* sp. varied between 6 and 100 $\mu g\ CO\ mg_{(protein)}^{-1}\ h^{-1}$ (King, 2003a). Substrate affinity, cell physiology and metabolic activity are potential explanations for such variability in specific activity estimates (Knief *et al.*, 2005) and will need more attention in future investigations to address how CO shapes microbial communities in the environment. Gene libraries suggested a more pronounced enrichment of carboxydovores belonging to δ -*Proteobacteria* in deciduous forest relative to both monocultures, but a qPCR assay targeting this specific subpopulation contradicted this observation. Incongruence of theoretical populations of carboxydovores and the abundance of δ -*Proteobacteria-coxL* sequences estimated by qPCR in maize plantation highlights the fact that carboxydovores belonging to this class cannot be used as an universal proxy for CO uptake activity in soil, due to the response of CO-oxidizer to

their environment resulting in the dominance of different taxonomic groups of carboxydovores in contrasting ecosystems (Dunfield *et al.*, 2005, King *et al.*, 2008, Weber *et al.*, 2010a). Considering this observation, we recommend the broader qPCR assay we developed, targeting the whole type I-*coxL* cluster, to test the relevance of this molecular marker in predicting CO uptake activity in soil for future investigations. These additional efforts, including samples displaying a broad range of CO uptake activity, are necessary because the regression analysis reported in Figure 13B was largely supported by the high CO uptake activity and *coxL* abundance in deciduous forest.

In conclusion, this work demonstrates the non-random distribution of CO-oxidizing bacteria in contrasting ecosystems, with land-use as a driver of diversification for this functional group. We showed that composition and abundance of CO-oxidizing bacteria community structure reflected CO uptake activity in soil. The combination of two complementary methodological approaches applied to independent soil surveys provides strong support and confidence to these observations. In contrast to the functional type I-CODH, the physiological role of type II-CODH remains to be defined as their distribution does not appear directly linked to CO uptake activity in soil and CO-oxidizing bacteria. Although this study was limited to three ecosystems, the soil survey resulted in the development of a reliable qPCR assay targeting presumptive CO-oxidizing bacteria in soil. A more extensive survey, including more ecosystem types is however necessary to challenge this quantitative indicator to predict CO oxidation rate in the environment. Finally, in addition to describe diversity of carboxydovore bacteria, this work suggests this functional group represents a significant proportion of soil microbiota. For instance, density of high affinity H₂-oxidizing bacteria responsible for 80% of the global loss of atmospheric H₂ is typically between 10⁶-10⁸ cells g_(soil-dw)⁻¹, as estimated by qPCR targeting the gene *hhyL* specifying the large subunit of their high affinity hydrogenase (Constant *et al.*, 2011b). These microorganisms compensate their low abundance by a much higher cell specific activity than carboxydovores, oxidizing H₂ at a rate of 2-3 amol cfu⁻¹ h⁻¹ in some streptomycetes (Constant *et al.*, 2011a). Because carboxydovores are abundant and taxonomically diverse, they should exert a significant impact on soil microbiota and biological processes. Future work thus should focus on the interactions of CO-oxidizing bacteria with microorganisms involved in other globally important biogeochemical functions. In addition to alter global budget of atmospheric CO, alteration of the distribution and activity of this functional group may have significant impacts on ecosystem services.

2.8 Acknowledgments

This research was supported by a grant from the *Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies* (FRQNT-New Researchers Start Up Program) to PC. The work of IL was supported by a NSERC – Undergraduate Student Research Awards and a Graduate student scholarship from the Fondation Universitaire Armand-Frappier INRS.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

L'influence des bactéries carboxydovores du sol sur la dynamique globale du CO a été suivie depuis plus de cinq décennies. L'incertitude dans la dynamique des flux du CO à la surface du sol complique le développement de modèles permettant de prédire le destin de son puits biologique en réponse au changement global, incluant l'utilisation des terres. Cette étude constitue une contribution importante dans le domaine de la biogéochimie du CO. Premièrement, l'utilisation d'outils statistiques a permis d'identifier les paramètres environnementaux plus influents sur l'activité de consommation du CO dans les sols échantillonnés. Deuxièmement, nous avons développé des outils moléculaires qui permettent l'identification et quantification (PCR et qPCR) des bactéries oxydant le CO atmosphérique, incluant un essai ciblant spécifiquement le groupe taxonomique des δ -protéobactéries soupçonnées d'avoir une haute affinité pour le CO et donc un rôle important dans le cycle biogéochimique du CO. Troisièmement, la combinaison des analyses moléculaires, avec la caractérisation des sols et des analyses statistiques (corrélations et analyses canoniques) a permis d'identifier et de quantifier les variations dans des populations de bactéries oxydant le CO atmosphérique en réponse au changement de l'environnement. Les résultats mettent en évidence que le changement d'utilisation des terres exerce une influence sur l'activité de consommation du CO en raison d'une variation de la composition et de l'abondance des bactéries oxydant le CO dans le sol. Le contenu en matière organique semblait un facteur important pour l'enrichissement de ce groupe fonctionnel dans la forêt de feuillus en raison de la production de CO chimiques ayant lieu dans la litière, mais des mesures de CO sur le terrain seraient importantes pour confirmer cette hypothèse dans le future. Cela pourrait se faire en utilisant soit une chambre à flux statique ou par le déploiement de profileur de gaz dans le sol, permettant ainsi que calculer la vitesse de production de CO *in situ*. Cette production de CO pourrait d'ailleurs être reproduite en laboratoire afin de vérifier si elle est suffisante pour favoriser l'enrichissement des bactéries oxydant le CO dans un sol modèle incubé dans des conditions contrôlées. Les travaux ouvriront la porte à d'autres investigations et pourraient prendre deux principales directions visant à : (i) identifier et caractériser les bactéries à haute affinité pour le CO et (ii) élaborer des modèles de nouvelle génération visant à prédire la vitesse d'oxydation du CO à partir d'une combinaison de données moléculaires et physicochimiques. Ces deux directions sont décrites dans les deux prochaines sections qui concluent ce mémoire.

Le résultat le plus excitant de ce projet de recherche est sans contredit la démonstration de l'activité de consommation du CO atmosphérique chez les δ -proteobactéries en utilisant *Halliangium ochraceum* comme microorganisme modèle. Selon nos analyses phylogénétiques et nos tests statistiques, les séquences *coxL* affiliées à ce groupe appartiendrait à des bactéries impliquées dans le puits biologique du CO, surtout en forêt. Jusqu'à présent, *H. ochraceum* est le seul représentant de ce groupe qui est disponible et il serait donc important d'isoler d'autres δ -protéobactéries du sol forestier et de valider leur capacité de consommer le CO. Il serait alors possible d'obtenir plus d'informations sur leur écophysiole et ainsi prévoir leur résistance, leur susceptibilité ou leur résilience au changement global. Il reste évidemment encore beaucoup à faire dans cette direction. Il faudrait isoler plus de bactéries démontrant une haute affinité pour le CO. Étant données notre incapacité d'isoler la plupart des microorganismes du sol, certains outils moléculaires, qui pourraient être développés en considérant les résultats de cette études, permettront une meilleure compréhension des bactéries oxydant le CO sans avoir à les cultiver. La cytométrie en flux couplée à la technique de l'hybridation *in situ* (FISH) ciblant le gène *coxL* permettrait de trier et séparer physiquement les microorganismes (non cultivables) possédant la ou les séquences *coxL* d'intérêt (e.g. δ -protéobactéries) des autres représentants de la communauté microbienne pour ensuite amplifier et séquencer leur génome. En plus de faciliter leur domestication subséquente en laboratoire, cette approche permettrait de documenter l'écophysiole de ces bactéries oxydant le CO dans les sols.

Une deuxième étape logique qui devra être franchie suite aux travaux présentés dans ce mémoire est la validation des modèles moléculaires (qPCR) permettant de prédire l'activité d'oxydation du CO dans le sol. Les outils moléculaires et statistiques développées dans cette étude sont un point de départ seulement. D'autres échantillons de sol devront être analysés afin de vérifier si les paramètres des analyses de régression (i.e. constantes liées à l'abondance de *coxL*) sont applicables à d'autres types d'écosystèmes. L'ajout de plus de prédictors (e.g. concentration de carbone) accompagnant les données moléculaires dans des régressions multiples pourrait probablement améliorer ces modèles. Ces équations permettraient de modéliser et de prédire l'impact du changement de l'utilisation des terres et autres activités anthropiques (utilisation de fertilisantes, libération des polluantes) sur l'activité de consommation du CO en plus de permettre une meilleure utilisation des données de séquences métagénomiques obtenues à partir d'échantillons environnementaux. Un défi majeur dans le domaine de la biogéochimie est d'intégrer les données moléculaires aux processus, et ces modèles représenteraient un premier pas dans cette direction.

BIBLIOGRAPHIE

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal in Molecular Biology* 215(3):403-410.
- Assonov S, Brenninkmeijer C, Jöckel P, Mulvaney R, Bernard S & Chappellaz J (2007) Evidence for a CO increase in the SH during the 20th century based on firn air samples from Berkner Island, Antarctica. *Atmospheric Chemistry and Physics* 7(2):295-308.
- Berg IA (2011) Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO₂ fixation pathways. *Applied and Environmental Microbiology* 77(6):1925-1936.
- Bergamaschi P, Hein R, Heimann M & Crutzen PJ (2000) Inverse modeling of the global CO cycle: 1. Inversion of CO mixing ratios. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 105(D2):1909-1927.
- Blanchet FG, Legendre P & Borcard D (2008) Forward selection of explanatory variables. *Ecology* 89(9):2623-2632.
- Borcard D, Gillet F & Legendre P (2011) *Numerical ecology with R*. Springer. 306p.
- Brankatschk R, Bodenhausen N, Zeyer J & Bürgmann H (2012) Simple absolute quantification method correcting for quantitative PCR efficiency variations for microbial community Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 78(12):4481-4489.
- Brasseur G, Orlando JJ & Tyndall GS (1999) *Atmospheric chemistry and global change*. Oxford University Press, New York. 654 p
- Chan ASK & Steudler PA (2006) Carbon monoxide uptake kinetics in unamended and long-term nitrogen-amended temperate forest soils. *FEMS Microbiology Ecology* 57(3):343-354.
Doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00127.x
- Chan LY, Lau WL, Zou SC, Cao ZX & Lai SC (2002) Exposure level of carbon monoxide and respirable suspended particulate in public transportation modes while commuting in urban area of Guangzhou, China. *Atmospheric Environment Journal* 36(38):5831-5840.
- Chevalier A, Gheusi F, Attié J-L, Delmas R, Zbinden R, Athier G & Cousin J-M (2008) Carbon monoxide observations from ground stations in France and Europe and long trends in the free troposphere. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions* 8(1):3313-3356.
- Chin M, Jacob DJ, Munger JW, Parrish DD & Doddridge BG (1994) Relationship of ozone and carbon monoxide over North America. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 99(D7):14565-14573.
- Conrad R (1994) Compensation concentration as critical variable for regulating the flux of trace gases between soil and atmosphere. *Biogeochemistry* 27(3):155-170.
- Conrad R (1996) Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiological Reviews* 60(4):609-640.
- Conrad R, Meyer O & Seiler W (1981) Role of Carboxydobacteria in consumption of atmospheric carbon monoxide by soil. *Applied and Environmental Microbiology* 42(2):211-215.
- 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. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 90(D3):5699-5709.

- Constant P, Chowdhury SP, Hesse L & Conrad R (2011a) Co-localization of atmospheric H₂ oxidation activity and high affinity H₂-oxidizing bacteria in non-axenic soil and sterile soil amended with *Streptomyces* sp. PCB7. *Soil Biology and Biochemistry* 43(9):1888-1893.
- Constant P, Chowdhury SP, Hesse L, Pratscher J & Conrad R (2011b) Genome data mining and soil survey for the novel group 5 [NiFe]-Hydrogenase to explore the diversity and ecological importance of presumptive high affinity H₂-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 77(17):6027–6035.
- Cunliffe M (2010) Correlating carbon monoxide oxidation with cox genes in the abundant marine *Roseobacter* clade. *The ISME journal* 5(4):685-691.
- Cunliffe M (2011) Correlating carbon monoxide oxidation with cox genes in the abundant Marine *Roseobacter* Clade. *ISME Journal* 5(4):685-691.
- Daniel JS & Solomon S (1998) On the climate forcing of carbon monoxide. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 103(D11):13249-13260.
- Davidge KS, Motterlini R, Mann BE, Wilson JL & Poole RK (2009) Carbon monoxide in biology and microbiology: Surprising roles for the “Detroit perfume”. *Advances in Microbial Physiology*. Robert KP (Editor) Academic Press, Vol Volume 56. p 85-167.
- Dawid W (2000) Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiology Reviews* 24(4):403-427.
- DeCoste NJ, Gadkar VJ & Filion M (2011) Relative and absolute quantitative Real-Time PCR-based quantifications of *hcnC* and *phlD* gene transcripts in natural soil spiked with *Pseudomonas* sp. Strain LBUM300. *Applied and Environmental Microbiology* 77(1):41-47.
- Deer DM, Lampel KA & González-Escalona N (2010) A versatile internal control for use as DNA in real-time PCR and as RNA in real-time reverse transcription PCR assays. *Letters in Applied Microbiology* 50(4):366-372.
- Degelmann DM, Borken W, Drake HL & Kolb S (2010) Different atmospheric methane-oxidizing communities in European beech and Norway spruce soils. *Applied and Environmental Microbiology* 76(10):3228-3235.
- Derendorp L, Quist JB, Holzinger R & Röckmann T (2011) Emissions of H₂ and CO from leaf litter of *Sequoiadendron giganteum*, and their dependence on UV radiation and temperature. *Atmospheric Environment* 45(39):7520-7524.
- Dixon P (2003) VEGAN, a package of R functions for community ecology. *Journal of Vegetation Science* 14(6):927-930.
- Dobbek H, Gremer L, Kiefersauer R, Huber R & Meyer O (2002) Catalysis at a dinuclear [CuSMo(O)OH] cluster in a CO dehydrogenase resolved at 1.1-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(25):15971-15976.
- Dobbek H, Gremer L, Meyer O & Huber R (1999) Crystal structure and mechanism of CO dehydrogenase, a molybdo iron-sulfur flavoprotein containing S-selanylcycteine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(16):8884-8889.
- Doi: 10.1073/pnas.96.16.8884
- Dobbek H, Svetlitchnyi V, Gremer L, Huber R & Meyer O (2001) Crystal structure of a carbon monoxide dehydrogenase reveals a [Ni-4Fe-5S] cluster. *Science* 293(5533):1281-1285.

- Dunfield KE & King GM (2005) Analysis of the distribution and diversity in recent Hawaiian volcanic deposits of a putative carbon monoxide dehydrogenase large subunit gene. *Environmental Microbiology* 7(9):1405-1412.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 32(5):1792-1797.
- Elghamry W & Elashkar M (1962) Simplified textural classification triangles. *Soil Science Society of America Journal* 26(6):612-613.
- Fudou R, Jojima Y, Iizuka T & Yamanaka S (2002) *Haliangium ochraceum* gen. nov., sp. nov. and *Haliangium tepidum* sp. nov.: Novel moderately halophilic myxobacteria isolated from coastal saline environments. *The Journal of General and Applied Microbiology* 48(2):109-115.
- GIEC (2001) Groupe de Travail I: Les bases Scientifiques. (GIEC Groupe d'experts intergouvernementaux sur l'évolution du climat). WMO & UNEP. 881p.
- GIEC (2014) Groupe de Travail I: Les bases Scientifiques. (GIEC Groupe d'experts intergouvernementaux sur l'évolution du climat.). WMO & UNEP. 1306p.
- Hardy KR & King GM (2001a) Enrichment of High-Affinity CO Oxidizers in Maine Forest Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 67(8):3671-3676.
- Hauglustaine DA, Brasseur GP, Walters S, Rasch PJ, Müller JF, Emmons LK & Carroll MA (1998) MOZART, a global chemical transport model for ozone and related chemical tracers: 2. Model results and evaluation. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 103(D21):28291-28335.
- Hille R (2005) Molybdenum-containing hydroxylases. *Archives in Biochemistry and Biophysics* 433(1):107-116.
- Holloway T & Levy I (2000) Global distribution of carbon monoxide. *Journal of Geophysical Research* 105. (D10)12123 – 12147.
- Ingersoll RB, Inman RE & Fisher WR (1974) Soil's potential as a sink for atmospheric carbon monoxide. *Tellus* 26(1-2):151-159.
- Inman RE, Ingersoll RB & Levy EA (1971) Soil: A Natural Sink for Carbon Monoxide. *Science* 172(3989):1229-1231.
- Khalil MA & Rasmussen R (2000) Soil-Atmosphere exchange of radiatively and chemically active gases. *Environmental Science & Pollution Research* 7(2):79-82.
- Kim Y & Park S (2012a) Microbiology and genetics of CO utilization in mycobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 101(4):685-700.
- Kimble L, Mandelco L, Woese C & Madigan M (1995) *Heliobacterium modesticaldum*, sp. nov., a thermophilic *heliobacterium* of hot springs and volcanic soils. *Archives in Microbiology* 163(4):259-267.
- Doi: 10.1007/bf00393378
- King CE & King GM (2014) Description of *Thermogemmatispora carboxidivorans* sp. nov., a novel carbon monoxide-oxidizing member of the *Ktedonobacteria* isolated from a geothermally-heated biofilm, and analysis of carbon monoxide oxidation by members of the *Ktedonobacteria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*
- King GM (1999a) Attributes of Atmospheric Carbon monoxide oxidation by Maine forest soils. *Applied and Environmental Microbiology* 65(12):5257-5264.

- King GM (1999c) Characteristics and significance of atmospheric carbon monoxide consumption by soils. *Chemosphere - Global Change Science* 1(1–3):53-63.
- King GM (2000a) Land use impacts on atmospheric carbon monoxide consumption by soils. *Global Biogeochemical Cycles* 14(4):1161-1172.
- King GM (2003a) Molecular and culture-based analyses of aerobic carbon monoxide oxidizer diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 69(12):7257-7265.
- King GM (2003c) Uptake of carbon monoxide and hydrogen at environmentally relevant concentrations by Mycobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 69(12):7266-7272.
- King GM & Crosby H (2002a) Impacts of plant roots on soil CO cycling and soil-atmosphere CO exchange. *Global Change Biology* 8(11):1085-1093.
- King GM & Hungria M (2002b) Soil-atmosphere CO exchanges and microbial biogeochemistry of CO transformations in a Brazilian agricultural ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology* 68(9):4480-4485.
- King GM & Weber CF (2007) Distribution, diversity and ecology of aerobic CO-oxidizing bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 5(2):107-118.
- 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 and Environments* 23(4):299-305.
- Knief C & Dunfield PF (2005) Response and adaptation of different methanotrophic bacteria to low methane mixing ratios. *Environmental Microbiology* 7(9):1307-1317.
- Legendre P & Gallagher E (2001) Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia* 129(2):271-280.
- Lozupone C & Knight R (2005) UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 71(12):8228-8235.
- Luo C, Rodriguez-R LM, Johnston ER, Wu L, Cheng L, Xue K, Tu Q, Deng Y, He Z, Shi JZ, Yuan MM, Sherry RA, Li D, Luo Y, Schuur EAG, Chain P, Tiedje JM, Zhou J & Konstantinidis KT (2014) Soil microbial community responses to a decade of warming as revealed by comparative metagenomics. *Applied and Environmental Microbiology* 80(5):1777-1786.
- Mirza BS, Potisap C, Nüsslein K, Bohannan BJM & Rodrigues JLM (2014) Response of free-living nitrogen-fixing microorganisms to land use change in the Amazon rainforest. *Applied and Environmental Microbiology* 80(1):281-288.
- Mörsdorf G, Frunzke K, Gadkari D & Meyer O (1992) Microbial growth on carbon monoxide. *Biodegradation* 3(1):61-82.
- Moxley JM & Smith KA (1998a) Carbon monoxide production and emission by some Scottish soils. *Tellus B* 50(2):151-162.
- Moxley JM & Smith KA (1998b) Factors affecting utilisation of atmospheric CO by soils. *Soil Biology and Biochemistry* 30(1):65-79.
- Nazaries L, Pan Y, Bodrossy L, Baggs EM, Millard P, Murrell JC & Singh BK (2013) Evidence of microbial regulation of biogeochemical cycles from a study on methane flux and land Use change. *Applied and Environmental Microbiology* 79(13):4031-4040.

- Novelli PC, Masarie KA & Lang PM (1998) Distributions and recent changes of carbon monoxide in the lower troposphere. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 103(D15):19015-19033.
- Novelli PC, Masarie KA, Lang PM, Hall BD, Myers RC & Elkins JW (2003) Reanalysis of tropospheric CO trends: Effects of the 1997–1998 wildfires. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 108(D15):4464.
- Oelgeschläger E & Rother M (2008) Carbon monoxide-dependent energy metabolism in anaerobic bacteria and archaea. *Archives in Microbiology* 190(3):257-269.
- Palmer K, Drake HL & Horn MA (2009) Genome-derived criteria for assigning environmental *narG* and *nosZ* sequences to operational taxonomic units of nitrate reducers. *Applied and Environmental Microbiology* 75(15):5170-5174.
- Pelzmann A, Ferner M, Gnida M, Meyer-Klaucke W, Maisel T & Meyer O (2009) The CoxD protein of *Oligotropha carboxidovorans* is a predicted AAA+ ATPase chaperone involved in the iogenesis of the CO dehydrogenase [CuSMoO₂] cluster. *The Journal of Biological Chemistry* 284(14):9578-9586.
- Pendall E, Schwendenmann L, Rahn T, Miller JB, Tans PP & White JWC (2010) Land use and season affect fluxes of CO₂, CH₄, CO, N₂O, H₂ and isotopic source signatures in Panama: evidence from nocturnal boundary layer profiles. *Global Change Biology* 16(10):2721-2736.
- Prosser JI (2010) Replicate or lie. *Environmental Microbiology*. 12(7):1806-1810.
- Ragsdale SW (2004) Life with Carbon monoxide. *Critical Reviews in Biochemical and Molecular Biology* 39(3):165-195.
- Reichenbach H (1999) The ecology of the myxobacteria. *Environmental Microbiology* 1(1):15-21.
- Sambrook J & Russell DW (2001) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. CSHL Press. 2344 p
- Sanhueza E, Cárdenas L, Donoso L & Santana M (1994a) Effect of plowing on CO₂, CO, CH₄, N₂O, and NO fluxes from tropical savannah soils. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 99(D8):16429-16434.
- Sanhueza E, Dong Y, LOBERT J & CRUTZEN P (1998) Carbon monoxide uptake by temperate forest soils: The effects of leaves and humus layers. *Tellus B* 50(1):51-58.
- Sanhueza E, Donoso L, Scharffe D & Crutzen PJ (1994b) Carbon monoxide fluxes from natural, managed, or cultivated savannah grasslands. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 99(D8):16421-16427.
- Santiago B, Schübel U, Egelseer C & Meyer O (1999) Sequence analysis, characterization and CO-specific transcription of the *cox* gene cluster on the megaplasmid pHCG3 of *Oligotropha carboxidovorans*. *Gene* 236(1):115-124.
- Doi: 10.1016/s0378-1119(99)00245-0
- Schimel JP & Gullledge JAY (1998) Microbial community structure and global trace gases. *Global Change Biology* 4(7):745-758.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ & Weber CF (2009) Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75(23):7537-7541.

- Singh BK, Tate K, Thomas N, Ross D & Singh J (2011) Differential effect of afforestation on nitrogen-fixing and denitrifying communities and potential implications for nitrogen cycling. *Soil Biology and Biochemistry* 43(7):1426-1433.
- Song T, Park SW, Park S-J, Kim JH, Yu JY, Oh J-I & Kim YM (2010) Cloning and expression analysis of the duplicated genes for carbon monoxide dehydrogenase of *Mycobacterium* sp. strain JC1 DSM 3803. *Microbiology* 156(4):999-1008.
- Steffen W, Crutzen PJ & McNeill JR (2007) The Anthropocene: are humans now overwhelming the great forces of nature. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 36(8):614-621.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24(8):1596-1599.
- Team RDC (2008) *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria(Consulté e Date Accessed)
- Tolli JD, Sievert SM & Taylor CD (2006) Unexpected diversity of bacteria capable of carbon monoxide oxidation in a coastal marine environment, and contribution of the Roseobacter-associated clade to total CO oxidation. *Applied and Environmental Microbiology* 72(3):1966-1973.
- Vasileiadis S, Puglisi E, Arena M, Cappa F, van Veen JA, Cocconcelli PS & Trevisan M (2013) Soil microbial diversity patterns of a lowland spring environment. *FEMS Microbiology Ecology* 86(2):172-184.
- Vitousek PM, Mooney HA, Lubchenco J & Melillo JM (1997) Human domination of earth's ecosystems. *Science* 277(5325):494-499.
- Wang WC, Yung YL, Lacin AA, Mo T & Hansen JE (1976) Greenhouse effects due to man-made perturbations of trace gases. *Science* 194(4266):685-690.
- Weber CF & King GM (2007) Physiological, ecological, and phylogenetic characterization of *Stappia*, a marine CO-oxidizing bacterial genus. *Applied and Environmental Microbiology* 73(4):1266-1276.
- Weber CF & King GM (2010a) Distribution and diversity of carbon monoxide-oxidizing bacteria and bulk bacterial communities across a succession gradient on a Hawaiian volcanic deposit. *Environmental Microbiology* 12(7):1855-1867.
- Weber CF & King GM (2010b) Quantification of *Burkholderia coxL* genes in Hawaiian volcanic deposits. *Applied and Environmental Microbiology* 76(7):2212-2217.
- Weber CF & King GM (2011) The phylogenetic distribution and ecological role of carbon monoxide oxidation in the genus *Burkholderia*. *FEMS Microbiology Ecology* 79(1) 167 – 175.
- Zhou X-W, Li S-G, Li W, Jiang D-E, Han K & Wu Z-H (2014) Myxobacterial community is a predominant and highly diverse bacterial group in soil niches. *Environmental Microbiology Reports* 6(1):45–56.

ANNEXE 1 : MATERIEL SUPPLEMENTAIRE (ARTICLE)

Supplementary Material

Impact of Land-Use on the Distribution and Potential Activity of CO-Oxidizing Bacteria in Soil

Liliana Quiza, Isabelle Lalonde, Claude Guertin, Philippe Constant*

Laboratory of Trace Gas Biogeochemistry, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada

* **Correspondence:** Philippe Constant, Laboratory of Trace Gas Biogeochemistry, INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada.

Philippe.Constant@iaf.inrs.ca

1. SUPPLEMENTARY FIGURES AND TABLES

In the next sections are provided the list of *coxL* sequences retrieved from public genome database and integrated into our extensive phylogenetic analysis (Table S1), specificity of the newly designed primers targeting *coxL* gene (Table S2) and the CO uptake activity measured in *Haliangium ochraceum* (Figure S1).

1.1 Supplementary Tables

Table S1. List of the included sequences in the extensive *coxL* database.

A) Type I- <i>coxL</i>	
Bacteria	Accession Number
<i>Mycobacterium smegmatis</i> MC2 155	AFP37210
<i>Mycobacterium</i> sp. JLS	ABN96292
<i>Mycobacterium</i> sp. KMS	ABL89718
<i>Mycobacterium</i> sp. MCS	ABG06612
<i>Mycobacterium</i> sp. DSM3803	ADA57154
<i>Mycobacterium vaccae</i>	ABC48602
<i>Mycobacterium phlei</i>	ABC48603

<i>Mycobacterium marinum</i> M	ACC39118
<i>Mycobacterium canettii</i>	CCC42714
<i>Mycobacterium ulcerans</i> Agy99	ABL02876
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CTRI 2	AEM98823
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CCDC5180	AEJ49183
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CCDC5079	AEJ45540
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> KZN 4207	AEB02509
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> KZN 1435	ACT23405
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> F11	ABR04721
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	ABQ72100
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	AAK44610
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> RGTB327	AFE15356
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG Mexico	AET17669
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG Moreau RDJ	CCC62972
<i>Mycobacterium africanum</i> GM041182	CCC25447
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG Tokyo 172	BAH24677
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG Pasteur 1173P2	CAL70396
<i>Rhodococcus opacus</i> B4	BAH53526
<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	ABG97013
<i>Rhodococcus equi</i> 103S	CBH49055
<i>Micromonospora</i> sp L5	ADU07549
<i>Micromonospora aurantiaca</i> ATCC27029	ADL45463
<i>Actinoplanes missouriensis</i> 431	BAL91001
<i>Arthrobacter</i> sp. FB24	ABK03419

<i>Conexibacter woesei</i> DSM14684	ABL79769
<i>Nocardioides</i> sp. JS614	ABL79769
<i>Nakamurella multipartita</i> DSM44233	ACV81553
<i>Pseudonocardia dioxanivorans</i> CB1190	AEA24861
<i>Haliangium ochraceum</i> DSM 14365	ACY14545
<i>Alkalilimnicola ehrlichii</i> MLHE 1	ABI56911
<i>Meiothermus ruber</i> DSM 1279	ADD28140
<i>Sphaerobacter thermophilus</i> DSM 20745	ACZ40190
<i>Rhodothermus marinus</i> SG0.5JP17 172	AEN74668
<i>Rhodothermus marinus</i> DSM 4252	ACY49636
<i>Polymorphum gilvum</i> SL003B 26A1	ADZ71436
<i>Thermaerobacter marianensis</i> DSM 12885	ADU51603
<i>Bradyrhizobium</i> sp. S23321	BAL79267
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	BAL07124
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 278	CAL79682
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	ABQ33958
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400 chromosome 1	ABE30822
<i>Sulfobacillus acidophilus</i> DSM 10332	AEW04034
<i>Sulfobacillus acidophilus</i> TPY A	EJ40384
<i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL 12	ABV92954
<i>Ruegeria pomeroyi</i> DSS 3	AAV95654
<i>Oligotropha carboxidovorans</i> OM5 pHCG3	AEI08106
<i>Haliscomenobacter hydrossis</i> DSM 1100	AEE53112

B) Type II-coxL	
Bacteria	Accession Number
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400 chromosome 1	CP000270
<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1002 chromosome1	ADG14199
<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1001	ADX53573
<i>Burkholderia phytofirmans</i> PsJN chromosome1	ACD14794
<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1003 chromosome1	ADN56134
<i>Burkholderia</i> sp. YI23	AET90569
<i>Variovorax paradoxus</i> EPS	ADU35966
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400 chromosome3	ABE35958
<i>Streptosporangium roseum</i> DSM 43021	ACZ89377
<i>Thermomicrobium roseum</i> DSM 5159	ACM04667
<i>Saccharomonospora viridis</i> DSM 43017	ACU97028
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338	CAL99883
<i>Sphaerobacter thermophilus</i> DSM 20745	ACZ38842
<i>Thermobispora bispora</i> DSM 43833	ADG87370
<i>Aeropyrum pernix</i>	ACL50613
<i>Aeropyrum pernix</i> K1	BAA81228.2
<i>Ramlibacter tataouinensis</i> TTB310	AEG92425
<i>Kyrpidia tusciae</i> DSM 2912	ADG07288
<i>Methylobacterium nodulans</i> ORS 2060	ACL56740
<i>Methylobacterium</i> sp. 4 46	ACA19758
<i>Azospirillum lipoferum</i> 4B	CBS86626
<i>Azospirillum lipoferum</i> 4B plasmid AZO p3	CBS89955

<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245	CCC97763
<i>Ralstonia eutropha</i> H16	CAJ91588
<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	AAZ59806
<i>Ralstonia solanacearum</i> Po82	AEG69183
<i>Ralstonia solanacearum</i> PSI07	CBJ51264
<i>Ralstonia solanacearum</i> CFBP2957	CBJ43165
<i>Ralstonia solanacearum</i> CMR15	CBJ38719
<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000	CAD15170
<i>Ralstonia pickettii</i> 12J	ACD26495
<i>Ralstonia pickettii</i> 12D	ACS62705
<i>Meiothermus silvanus</i> DSM 9946	ADH64544
<i>Blastococcus saxobsidens</i> DD2	CCG05588
<i>Rubrobacter xylanophilus</i> DSM 9941 A	BG03091
<i>Rubrivivax gelatinosus</i> IL144	BAL97261
<i>Deinococcus gobiensis</i> I 0	AFD26460
<i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300	ABF46241
<i>Geodermatophilus obscurus</i> DSM 43160	ADB77455
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	BAC45601
<i>Polaromonas</i> sp. JS666	ABE42537
<i>Thermobaculum terrenum</i> ATCC BAA 798 chromosome2	ACZ43132
<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i> DSM 10331	ACU54491
<i>Verminephrobacter eiseniae</i> EF01 2	ABM60241
<i>Cupriavidus necator</i> N 1 chromosome1	AEI75824
<i>Cupriavidus taiwanensis</i> LMG 19424	CAP63049

<i>Cupriavidus necator</i> N 1 chromosome2	AEI79735
<i>Delftia acidovorans</i> SPH 1	ABX34889
<i>Delftia</i> sp. Cs1 4	AEF91417
<i>Chloroflexus</i> sp. Y 400 fl	ACM55104
<i>Chloroflexus aggregans</i> DSM 9485	ACL23891
<i>Chloroflexus aurantiacus</i> J 10 fl	ABY36652
<i>Azorhizobium caulinodans</i> ORS 571	BAF88936
<i>Alicyclophilus denitrificans</i> K601	AEB84595
<i>Alicyclophilus denitrificans</i> BC	ADU99716
<i>Mesorhizobium ciceri</i> biovar biserrulae WSM1271	ADV12586
<i>Thermomonospora curvata</i> DSM 43183	ACY99762
<i>Frankia</i> sp. EAN1pec	ABW12619
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisA53	ABE38261
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB5	ABE40936
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> HaA2	ABD08650
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB18	ABD90051
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> DX 1	ADU46385
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> TIE 1	ACF03636
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> KD131	ACM01053
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17025	ABP70044
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4	ABA79038
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17029	ABN76633
<i>Rhodospirillum rubrum</i> F11	AEO47465
<i>Rhodospirillum rubrum</i> ATCC 11170	ABC21767

<i>Rhodospirillum centenum</i> SW	ACI98494
<i>Pseudovibrio</i> sp. FO BEG1	AEV35537
<i>Mesorhizobium opportunistum</i> WSM2075	AEH88383
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	BAB54109
<i>Parvibaculum lavamentivorans</i> DS 1	ABS64568
<i>Amycolatopsis mediterranei</i> S699	AEK40389
<i>Amycolatopsis mediterranei</i> U32	ADJ43681
<i>Gordonia bronchialis</i> DSM 43247	ACY23459
<i>Niastella koreensis</i> GR20 10	AEW01397
<i>Agrobacterium radiobacter</i> K84	ACM28010
<i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	CCE97589
<i>Sinorhizobium meliloti</i> SM11	AEH80406
<i>Sinorhizobium meliloti</i> AK83	AEG54752
<i>Sinorhizobium meliloti</i> BL225C	AEG05716
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	CAC47570
<i>Silibacter</i> sp. TM1040	ABF64498
<i>Nitrobacter hamburgensis</i> X14	ABE62276
<i>Fibrella aestuarina</i> BUZ 2	CCH02895
<i>Roseobacter litoralis</i> Och 149	AEI93739
<i>Variovorax paradoxus</i> S110	ACS18245

Table S2. Optimisation of the uni-coxL assay developed by King (2003) and verification of the specificity of the type I-coxL assay developed in this study. Original and the newly designed primers are on the grey and white lines, respectively.

Name	Target	Sequence (5' to 3')	Specificity with "X" mismatches						
			n	1	2	3	4	5	6
OMP-forward	Type I	GGCGGCTTYGGSAAASAAGGT	53	13	7	2	0	0	0
BMS-forward	Type II	GGCGGCTTYGGSTCSAAGAT	90	19	9	10	4	2	1
uni820-forward	Type I & II	GGBGGBGGYTTYGGCWMSAA	143	19	1	0	0	0	0
O/B-reverse	Type I & II	YTCGAYGATCATCGGRTTGA	143	30	23	6	4	4	1
uni1611-reverse	Type I & II	GTBKCRGTGNCCCTGNCC	143	20	4	1	0	1	0
OMP1288-forward	Type I	TSKKYACSGGCWSSTA	53	8	1	1	0	0	0
OMP1540-reverse	Type I	TARTYRCCSSWRTCRTA	53	8	0	0	0	0	0

1.2 Supplementary Figure 1

Growth of *Haliangium ochraceum* DSM 14365 (purchased at the Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) in liquid medium was not successful. We thus adapted the CO oxidation assay to biomass grown on agar media. Briefly, 500 ml gastight Wheaton® glass bottles with rubber septum caps were sterilized and aseptically filled with 50 ml VY/4-SWS Agar (DSMZ 985 medium). The pre-poured bottles were left to stand at 4°C during one week, with the septum caps loosen but protected by aluminum foil, to allow background CO gas produced during medium sterilisation to evacuate the bottles before the experiments. The agar bottles were then inoculated with a dense inoculum of *H. ochraceum* harvested from a plate to ensure confluent bacterial growth in the bottles. Defined volume of CO gas mixture (508 ± 10 ppmv CO, GST-Welco, Pennsylvania, U.S.A.) was injected to get ~3 ppmv in the static headspace after inoculation and the bottles were incubated 9 days at 30°C. Decrease of the CO mixing ratio was monitored as a function of time by analyzing aliquots (10 ml) of the headspace air in a Trace Analytical Reduced Gas Analyzer (ta3000R, Ametek Process Instruments®, Delaware, U.S.A.). Although expression of cell-specific activity (zmol

c.f.u.⁻¹ h⁻¹) was not possible, this approach was appropriate to confirm CO uptake activity in the strain (Figure S1).

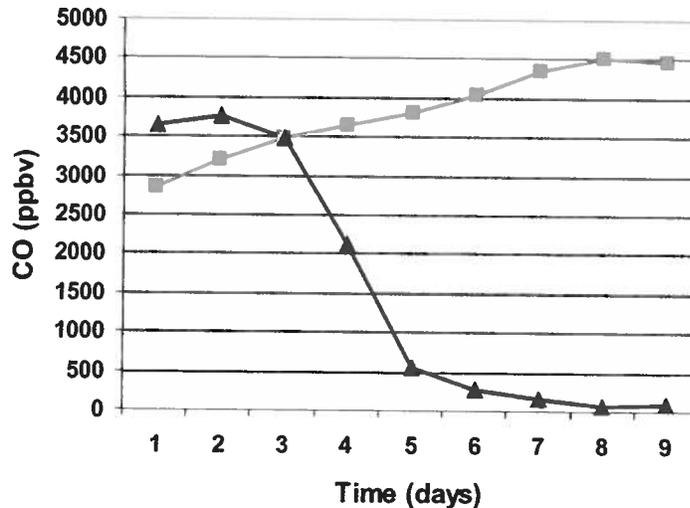


Figure S1. Representative CO oxidation activity in *H. ochraceum* (black triangle; ▲) in comparison to background emissions of CO in control experiment containing sterile medium (grey squares; ■). The lowest CO concentration measured in the headspace was 66 ppbv, confirming the ability of the strain to scavenge atmospheric CO (typical background level of CO in the atmosphere is ~120 ppbv).

1.3 Origin of DNA templates used as standard for the qPCR

Clone 55M3 is a clone originated from the present study, it is derived of soil samples from the Larch station (M).

Haliangium Ochraceum DSM 14365 strain is a myxobacterium Isolated from coastal seaweed or sea grass, is an obligate aerobic and moderately halophilic, requiring 1–3% NaCl for optimal growth. Analyses of 16S rRNA gene sequences reveal that they form a relatively homogeneous cluster within the δ -subclass of δ -*Proteobacteria*.

1.4 Efficiency of qPCR

According to different authors (Bustin et al., 2009, Vaerman et al, 2004) real time PCR data analysis performance must be evaluated in accordance of several factors in order to generate reliable results. Efficiency, specificity, precision, accuracy, linearity, limit of detection and many other factors reveal the quality and reliability of the quantification. In our case, as we

worked in absolute quantification mode, the efficacy was not the determinant aspect to analyse our data. The main factor impairing high efficiency was the use of highly degenerated primers. We recognize that efficiency is highly important when working in relative quantification mode, but this was not the case in this study. All the quantifications were within the calibration curve.

We were confident on the specificity of the assays from the primers design and protocol optimisation that was also certified by a consistent melting curve, and we ensured accuracy by working with an purified and calibrated standard (clone 55M3) having as a result an optimal linearity with our samples occurring within the standard curve and R^2 values above 0.98 The raw values were higher than the detection limit determined by the standard curve.

1.5 RDA: Raw data utilized for RDA analysis and statistical concepts

Table S3. Standardized Physicochemical properties of sampled soils.

Samples	Carbon	Nitrogen	C/N	K	P	CO	pH	H2O
A1	-0.624	-0.522	-1.346	1.892	1.428	-0.760	1.161	0.730
A2	-0.710	-0.826	1.984	-0.179	1.131	-0.274	0.438	1.296
A3	-0.690	-0.750	0.498	0.486	1.218	0.049	1.668	1.274
M1	-0.497	-0.484	-0.321	-0.441	-0.591	-0.919	-0.285	-0.336
M2	-0.532	-0.484	-0.672	0.252	-0.529	-1.273	0.299	-0.304
M3	-0.592	-0.522	-0.991	0.861	-0.381	-0.109	-0.209	0.594
F1	0.743	0.805	-0.010	-1.227	-1.118	0.857	-1.254	-1.173
F2	0.751	0.615	0.642	-1.204	-1.081	0.443	-1.255	-0.859
F3	2.151	2.170	0.217	-0.441	-0.077	1.984	-0.562	-1.222

Table S4. Raw data. OTU frequency table in the nine samples stations.

(1)

	A2B27	A1B36	A1A30	A2B45	A1B12	A2A20	26A3	44A3	A2C9	M1B3	51M3	48A3	6A3	31A3
A1	1	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A2	2	0	0	1	0	1	1	2	2	1	1	0	0	0
A3	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	2	1	3
M1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
M2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
F1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(2)

	M1A2	M1A4	M2C9	M1A22	M1B38	M1B45	M2A6	M2A14	M2A46	M2A65	F165	7M3
A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M1	1	2	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0
M2	0	0	1	0	1	2	1	1	1	1	1	0
M3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
F1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
F2	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
F3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

(3)

	56M3	64M3	F2A71	F1A13	89F3	F2B8	F2A50	F171	F174	6F3	F2A42	3F3	13F3
A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M3	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F1	0	0	5	1	3	1	2	1	1	1	0	0	0
F2	0	0	3	0	2	4	2	2	1	0	2	0	0
F3	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3	0	1	2

1.5.1 Forward selection

Forward selection is a method to select objectively, environmental variables in order to obtain a parsimonious subset of environmental variables to model multivariate community structure. In this approach, one adds variables to the model one at a time. At each step, each variable that is not already in the model is tested for inclusion in the model. The most significant of these variables is added to the model, so long as its P-value is below some pre-set level (Blanchet et al, 2008).

1.5.2 Hellinger transformation

Similarity measures commonly used by community ecologists, such as species presence-absence or abundance data need to be transformed before being incorporated into canonical ordination analysis such as RDA. The net result is an analysis that will preserve the chosen distances among objects. **Hellinger transformation** is one method of transformation that allows to retain the identity of individual species in biplots by quantifying the similarity between two probability distributions. The Hellinger distance is a measure recommended for clustering or ordination of species abundance data containing zero values (and this was the case in this study) resulting to asymmetric species distribution matrix that are not suitable for ordination analysis without transformation. Transformed dataset is then used to derive an Euclidian distance matrix utilized for downstream canonical analysis. We thus eliminated the asymmetric weight of “0” values by transforming our data with the Hellinger transformation using the following equation (Legendre & Gallagher, 2001) implemented in R software:

$$y'_{ij} = \sqrt{\frac{y_{ij}}{y_{i+}}}$$

Where y'_{ij} is the transformed abundance of the i^{th} OTU in the j^{th} sample, y_{ij} represents the raw abundance data of the i^{th} OTU in the j^{th} sample and y_{i+} represents the sum of the raw abundance of the i^{th} OTU in all the samples. The Hellinger distance offers a better compromise between linearity and resolution than the chi-square metric and the chi-square distance.

1.6 UniFrac

UniFrac, is a web application that allows researchers to determine whether communities are significantly different, to compare many communities simultaneously using clustering and ordination techniques, and to measure the relative contributions of different factors, such as chemistry and geography, to similarities between samples (Lozupone, 2005). UniFrac uses phylogenetic information and multivariate statistical techniques to determine whether microbial communities are significantly different, identify individual lineages that contribute to these differences, and reveal broad patterns relating many environmental samples. The analysis reflects differences between the lineages that are adapted to live specifically in one environment or the other (Lozupone, 2006).

For our UniFrac test we provide two input files: a single rooted phylogenetic tree of *coxL* clone sequences (format Nexus or Newick) and an environmental file describing from which station each sequences came (Lozuponne 2006). The aim of this analysis is to assess a the phylogenetic distance of each clone sequence from a common ancestor and then test the hypothesis that specific sequences are adapted to ecosystem type (i.e. larch monoculture, maize monoculture and deciduous forest). It is also possible to use UniFrac distance score matrix to group samples according to their similarity in term of *coxL* genetic profile and this is what we did with the UPGMA analysis shown in the article. The significance of UniFrac distance score is assessed by Monte Carlo manipulation of the clone dataset allowing the investigator to confirm that observations are significantly different than random distribution of the sequences (the ecosystem assignment in the environmental file are randomly changed and the UniFrac distance score between the ecosystem is calculated, this is repeated 1000 times). In this later analysis, jackknife test consisted in reducing the initial *coxL* sequence dataset (to 75% of the clone sequence) and re-run the UniFrac distance matrix calculation and UPGMA.

1.7 Diversity measure:

Shannon and Simpson Index are diversity measures that refer to species richness indices, based on the proportional abundances of species (evenness/dominance measures), and species abundance models (Hill et al., 2003) In our case these indices were calculated from OTUs *coxL* sequences in nucleic acids with the software R.

Shannon Index

Is a commonly used richness diversity index that takes into account both abundance and evenness of species present in the community. It is explained by the formula:

$$H' = - \sum p_i \ln p_i$$

Where p_i is the proportions of clones in the i th OTU. Here, a high value of H' would be a representative of a diverse community (high richness) and lower values represent less diverse community (low richness). A value of 0 would represent a community with just one species (Hill et al., 2003).

Simpson Index

Simpson's diversity index (D) is a mathematical measure that characterizes species evenness in a community. The proportion of species i relative to the total number of species (p_i) is calculated and squared, so the full community D is simply $\sum p_i^2$ where p_i is the proportion of clones in the i th OTU (Hill et al., 2003). High values are associated with samples dominated by a few OTU:

$$D = \sum p_i^2$$

These diversity indexes were highly relevant to show that *coxL* genotype was different in deciduous forest in comparison to larch and maize monocultures. In the forest, *coxL* sequence richness (H') was lower and evenness index (D) was higher than both monocultures. This distinction is important to the reader who can understand that deciduous forest contained less *coxL* genotypes (profile dominated by few OTU) – a more specialized CO-oxidizing bacteria community responsible for the higher CO uptake activity measured in this ecosystem.

1.8 Figure 7. Clusters explained.

Table S5. Detail of cluster *coxL* type I: OTUs corresponding to each cluster are classified by original sampling station.

CLUSTER	OTU/Origin Site								
	A1	A2	A3	M1	M2	M3	F1	F2	F3
CLUSTER A				M1B38	M2B33			F2A29 F2A51	
Arthrobacter						42M3			
Nakamurella			12A3						
CLUSTER B						63M3	F1A13 F1A23 F1A3 F178 F1A11 F164 F1A43 F1A12 F1A30	F2B11 F2A15 F2A38 F2A38	92F3 88F3 28F3 47F3 99F3 27F3
CLUSTER C			A342		M2B28				
Haliangium		A2B52				51M3 41M3	F187 F1A17 F1A27 F198 F139 F1A44 F136 F162	F2A33 F2B6 F2A40 F2A12 F2A1 F2A46 F2A45 F2A43	6F3 47F3 17F3 44F3 89F3 23F3 60F3 51F3 42F3
CLUSTER D					M2C19 M2A47			F2A22 F2A24 F2A28 F2A44	
Burkholderia			21A3 32A3	M1B45 M1B46	M2A2 M2C28 M2A55 M2C12 M2A19 M2C13	58M3			
CLUSTER E		A2B28 A2C9	31A3 A360 36A3		M2C2 M2A44	30M3 31M3 46M3	F1A53 F179 F188	F2A50 F2B18 F2A11 F2A23 F2A63 F2A39	91F3 86F3 34F3
CLUSTER F			11A3				F1A51 F171	F2B13 F2B8 F2A4 F2A47	40F3 48F3
								F2B7 F2A14	

								F2A54 F2A58 F2A41 F2B4 F2A53	
CLUSTER G				M1A2	M2A14		F1A15		80F3
CLUSTER H		A2B40						F2A42 F2A72	3F3
CLUSTER I			38A3			71M3 56M3 44M3			

Table S6. Detail of cluster *coxL* type II. OTUs corresponding to each cluster are classified by original sampling station.

CLUSTER	OTU/Origin Site								
	A1	A2	A3	M1	M2	M3	F1	F2	F3
Mezorhizobium	A1A10	A2B45	19A3	M1A10	M2B22	22M3	F165	F2B24	41F3
	A1B59	A2B31	44A3	M1A20	M2C9	50M3	F1A50	F2A7	7F3
	A1A6	A2B18	A354	M1A4	M2B35	39M3	F1A21	F2A48	13F3
	A1A30	A2B13	30A3	M1A9	M2B19	43M3			32F3
	A1B37	A2A12	47A3	M1A22	M2A29	64M3			14F3
	A1B29	A2B33	35A3	M1B4	M2C17	33M3			8F3
	A1A37	A2A40				53M3			
		A2B9							
		A2A33							
		A2B46							
		A2C30							
		A2A39							
		A2B27							
		A2C7							
		A2C36							
CLUSTER A			6A3	M1A5		73M3			45F3
CLUSTER B				M1A31 M1B35	M2B46				
CLUSTER C		A2A27	2A3 48A3 26A3	M1A11	M2C27 M2A8 M2A65 M2C4 M2B26	19M3 67M3 69M3		F2A73	15F3 62F3 77F3
CLUSTER D	A1A24 A1A33 A1B38	A2C5 A2A20 A2B50	53A3 40A3	M1A13 M1B50 M1B3	M2B30 M2A31	65M3 37M3			36F3 109F3 5F3
CLUSTER E	A1A29								16F3
CLUSTER F	A1B61				M2A13 M2C26		F174	F2A74 F2A89	11F3
CLUSTER G		A2B55		M1A18 M1B23					
CLUSTER H	A1A1 A1A5	A2A54	50A3		M2A53 M2C25 M2A6	9M3	F133		
CLUSTER I	A1B12 A1A20			M1B48	M2A46 M2C15	32M3			

Annexe references

Bustin A. S., Benes V., Garson j., Hellemans J., Huggett j., Kubista., Mueller R., Nolan T, Pfaff M., Shipley G., Vandesompelej., Wittwer C (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative Real-Time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55(4) 611 – 622.

Hill T., Walsh K.A., Harris J.A., Moffett B. F. (2003). Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology* 43, 1 -11.

King G. M. (2003). Molecular and culture-based analyses of aerobic carbon monoxide oxidizer diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (12) 7257 - 7265

Vaerman J.L, Saussoy P., Ingargiola I (2004). Evaluation of real-time PCR data. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 18, 212 -214

