



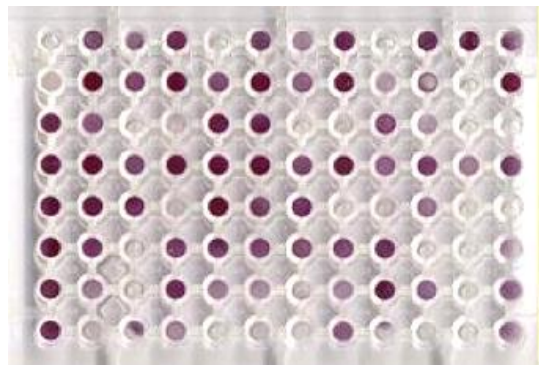
**Faculté des Sciences de Montpellier**  
Place Eugène Bataillon  
34095 Montpellier FRANCE



**IRD UMR Eco&Sol,**  
**Ecologie fonctionnelle et Biogéochimie**  
**des sols et des Agroécosystèmes**  
Campus SupAgro, Bat-12,  
2 Place Viala,  
34060 Montpellier FRANCE

## Synthèse Bibliographique

### **Les Eco-Plates de Biolog™ : Système, Utilisation et Limites en Ecologie Fonctionnelle des Sols.**



#### **Résumé :**

Dans le cadre du projet SECuRE pour la restauration des sols dans les agrosystèmes de Madagascar, nous cherchons à savoir si les Eco-plates de Biolog™ sont appropriées pour suivre cet effet de restauration suite à l'apport de différents amendements. Ces plaques contenant une série de substrats permettent de profiler les activités métaboliques potentielles d'une communauté bactérienne du sol et ainsi de visualiser l'effet d'un amendement sur les fonctions de l'agrosystème.

Anne-Cécile Vain  
[annececile.vain@gmail.com](mailto:annececile.vain@gmail.com)  
L3 Science de la vie  
Parcours Microbiologie – 2017 / 2018

**Encadrants :**  
Laetitia Bernard, chercheuse IRD  
Eric Blanchart, chercheur IRD

## Introduction

Le projet SECuRE (pour Soil ECological function REstoration), porté par l'UMR Eco&sols (Ecologie fonctionnelle et biogéochimie des sols et des Agroécosystèmes) à Madagascar, vise à améliorer les connaissances sur les processus du sol dans les agroécosystèmes tropicaux de Madagascar afin de développer des pratiques agricoles basées sur leur restauration. Il regroupe l'UR CIRAD AIDA, le Laboratoire des radio-isotopes de l'Université d'Antananarivo et l'Institut de Recherche FOFIFA à Madagascar. Les sols de Madagascar sont des sols anciens et très dégradés : faible teneur en matière organique (MO) et en nutriments disponibles. Ces conditions ne permettent pas aux organismes de se développer et donc d'assurer durablement les fonctions à la base des services de production de biomasse et recyclage des nutriments dans l'agrosystème. Il est nécessaire de restaurer ces habitats pour favoriser la biodiversité et donc développer ces fonctions des sols agricoles. Cela permettrait ainsi d'augmenter la capacité de résilience des agrosystèmes face à des stress (notamment hydrique) et des pathologies, et donc d'optimiser leur gestion de manière durable. S'orienter vers cette optimisation nécessite d'avoir des indicateurs rapides et pertinents pour mesurer les processus exprimés en réponse aux différentes pratiques agricoles, notamment le stockage de la MO. Les microorganismes telluriques (bactéries et champignons), à travers leurs activités enzymatiques extracellulaires, sont des acteurs importants des multiples étapes de transformation de la MO. Leur comportement métabolique est très fortement lié aux conditions du sol, elles-mêmes sous le contrôle des pratiques agricoles, modifiant ainsi les cycles biogéochimiques. Dans le projet SECuRE, nous faisons le postulat que le profil métabolique des communautés microbiennes des sols pourrait être un bon bio-indicateur de la trajectoire d'un agroécosystème en termes de séquestration nets de matière organique dans les sols.

Le but de cette synthèse bibliographique est d'étudier le système Eco-plate de Biolog<sup>TM</sup> qui permet de mettre en évidence le profil métabolique potentiel d'une communauté bactérienne du sol. L'objectif est d'en comprendre le fonctionnement et les limites pour décider des conditions optimales d'utilisation en milieu tropical. Cette recherche a également pour objectif d'appréhender les différentes interprétations écologiques des profils déjà publiés dans la littérature.

## Synthèse

### Le système Eco-plate

L'Eco-plate est une microplaque de 96 puits dans lesquels se trouvent un substrat carboné et un colorant. Cette plaque doit être inoculée par une solution environnementale contenant une communauté microbienne provenant notamment du sol. Elle regroupe 3 répliques d'une série de 31 substrats carbonés et un contrôle négatif (eau). Ces substrats représentent 6 classes différentes de composés carbonés : amines/amides, hydrates de carbone, polymères de carbone, acides carboxyliques, acides aminés, phosphates organiques (Preston-Mafham *et al.*, 2002) (**Annexe 1**). Ils représentent les sources de carbone les plus retrouvés dans l'environnement terrestre, la majorité d'entre eux étant issus de matière végétale (exemple : D-Xylose). Ce choix de substrats a été déterminé ainsi pour apporter des informations suffisantes et pertinentes dans le cas d'étude des populations bactériennes de l'environnement. Par ailleurs, chaque puits contient aussi un sel de tétrazolium qui sert d'indicateur coloré positif. En effet ce sel va jouer le rôle d'accepteurs d'électron artificiel dans la chaîne respiratoire des bactéries. Ainsi, lorsque les bactéries métabolisent le substrat, ce sel est réduit de manière irréversible en un composé violet insoluble : le formazan (Tachon *et al.*, 2009). La production de formazan est alors quantifiée par mesure de la densité optique à 590 nm (OD<sub>590nm</sub>). L'OD<sub>590nm</sub> est alors proportionnelle à la consommation du substrat.

La simple observation globale des puits permet d'obtenir une image rapide de la communauté : leur Profil Métabolique ou CLPP pour Community-Level Physiological Profile (Garland *et al.*, 1997 ; Stefanowicz *et al.*, 2006 ; S.Kvas *et al.*, 2017). Après quoi, on peut quantifier leur capacité métabolique pour chaque substrat (absorbance du puits), quantifier leur activité globale (Average Well Colour Development, AWCD) et aussi mesurer des indices de diversité fonctionnelle dans la communauté (la richesse fonctionnelle, indice de Shannon, la régularité) (Preston-Mafham *et al.*, 2002). Ces informations peuvent ensuite être analysées statistiquement notamment par des approches multivariées telles que l'Analyse en Composante Principale (ACP).

## Protocole et précautions

Le principe général des protocoles d'Eco-plate est relativement le même entre les études : un % p/v de sol frais est mis en solution dans du tampon. Après agitation, centrifugation et décantation, chaque inoculum est dilué de sorte à inoculer environ 100 µL dans les puits de sorte à amener la même densité cellulaire pour tous les échantillons. Après quoi un suivi par spectrophotométrie à 590nm est réalisé, sur une période allant de 24 à 144 h. Ci-dessous sont justifiées les raisons de ces démarches et les quelques précautions à effectuer pour assurer une interprétation représentative de la diversité fonctionnelle microbienne du sol.

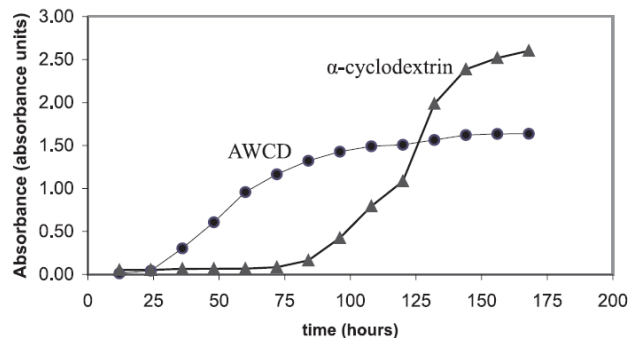
Dès le prélèvement de l'échantillon les composants physico-chimiques et biotiques de l'environnement bactérien varient, favorisant certaines espèces au détriment d'autres (Pennanen *et al.*, 2001). Davantage si l'échantillon subit des traitements comme un tamisage qui, en modifiant l'oxygénation de l'échantillon, accentuera l'activité de certaines bactéries. Une filtration, visant à éliminer les particules solubles de sol, induira l'exclusion des bactéries restées fixées aux particules de sols (Preston-Mafham *et al.*, 2002). Par ailleurs la conservation de l'échantillon en chambre froide ou en congélation modifiera significativement la diversité fonctionnelle de l'échantillon (Shishidoa *et al.*, 1998). Il est donc préconisé de conditionner les échantillons de sols bruts dans des fioles refermables pour préserver l'humidité relative de l'échantillon et d'inoculer les Eco-Plates le jour même, au mieux dans les 10 h suivant l'échantillonnage (Ameryckx *et al.*, 1957).

La densité cellulaire entre les échantillons doit être la même pour pouvoir comparer leur profil métabolique. Pour assurer cette équivalence et déterminer la dilution nécessaire à appliquer à chaque échantillon pour l'obtenir, Calbrix *et al.* (2005) proposent de réaliser des énumérations préliminaires des Colony Forming Units (CFU) dans ces sols et d'adapter la dilution pour inoculer 1500 CFU par puits. D'autre part, une centrifugation serait indispensable pour réduire la densité en composé carboné soluble du sol (substances humiques et matière organique) qui induira une coloration de fond plus rapide et non spécifique des puits (Calbrix *et al.*, 2005). Par ailleurs, on peut observer une extinction de la diversité fonctionnelle lors d'une série de dilutions causée par la perte d'espèces moins représentées dans l'échantillon au rôle pourtant clé dans la communauté (Gomez *et al.*, 2004). Cette caractéristique d'« extinction –dilution » est aussi exploitée pour l'analyse statistique (Rutgers *et al.*, 2016).

La température d'incubation conseillée par Biolog<sup>TM</sup> est comprise entre 15 et 28°C (Annexe 1). Mais pour des sols tropicaux, comme dans le projet SECuRE, Nurulita *et al.* (2016) proposent d'incuber les plaques à 30°C et Chakraborty *et al.*, (2011) à 28°C.

La réduction du formazan ne s'opère pas en anaérobie, pour éviter de rater la coloration d'un substrat alors qui serait métabolisé, la concentration en oxygène doit donc être homogène dans la plaque. (Preston-Mafham *et al.*, 2002).

Le temps d'incubation doit permettre la métabolisation de chaque substrat sans en saturer certains (la saturation, potentiellement due à des croissances cryptiques, surestime la capacité de la communauté à métaboliser ce substrat). Aucun temps n'étant optimal pour gérer ces disparités, il est nécessaire de réaliser une cinétique de l'absorbance en fonction du temps (Fig.1). L'incubation peut durer de 24 à 144 h, avec une fréquence d'absorbance toutes les 12 (Yin *et al.*, 2014) ou 24h (Harcha *et al.*, 1997 ; Gryta *et al.*, 2014) de par la faible densité cellulaire inoculée.



**Figure 1:** Courbes de l'absorbance d'un puits ( $\alpha$ -cyclodextrin) et de l'AWCD obtenues à partir d'une plaque Biolog™ (Stefanowicz *et al.*, 2006)

Par ailleurs, Pierce *et al.* (2014) ont décrit le cas de faux positifs dans des solutions contenant plus de 100 ppm de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) : « l'effet calcium ». Ces cations réagissent avec le formazan et cet effet serait augmenté en présence d'ions complexés à la matière organique, comme les  $\text{Mg}^{2+}$ . Dans le cadre du projet SECuRE, il n'y aurait pas de risque d'observer cet effet car les sols de Madagascar sont pauvres en calcium. Cependant, certains sols auront été chaulés à la dolomie ou à la cendre. Dans ce cas il sera nécessaire de quantifier la teneur en  $\text{Ca}^{2+}$  et d'appliquer une dilution adaptée pour la réduire sous le seuil de significativité (Pierce *et al.*, 2014).

A titre d'exemple, le protocole de Siles *et al.*, (2014), (Siles *et al.*, (2016) ; Margesin *et al.* (2017)) propose de mettre en solution 10% p/v de sol dans un tampon salin stérile NaCl 0.85% à pH=7. Après quoi la solution est agitée pendant 1 h à 150 rpm. Puis la solution est diluée ( $10^{-4}$ ) pour finalement inoculer 130  $\mu\text{L}$  dans chaque puits. D'autres tampons peuvent être utilisés, dans ce cas les proportions % p/v varient. Cependant, le tampon phosphate est à proscrire car il représente une source nutritive pour les bactéries et son phosphate réagit avec le zinc en solution dans le sol donne des faux négatifs (Stefanowicz *et al.*, 2006). D'autres protocoles proposent aussi de réaliser une étape de décantation, avant la dilution d'inoculation (Klimek *et al.*, 2015), ou après la première agitation (Gomez *et al.*, 2014) pour que les bactéries consomment les sources restantes de carbones solubles dans l'échantillon et éviter les sur-colorations. Dans un contexte climatique tropical, seule la température d'incubation est adaptée à 28°C ou 30°C (Chakraborty *et al.*, 2011 ; Yin *et al.*, 2014). En effet, Nurulita *et al.* (2016) applique même le protocole de Girvan *et al.* (2002) utilisé sur des sols de climat tempéré océanique (Angleterre).

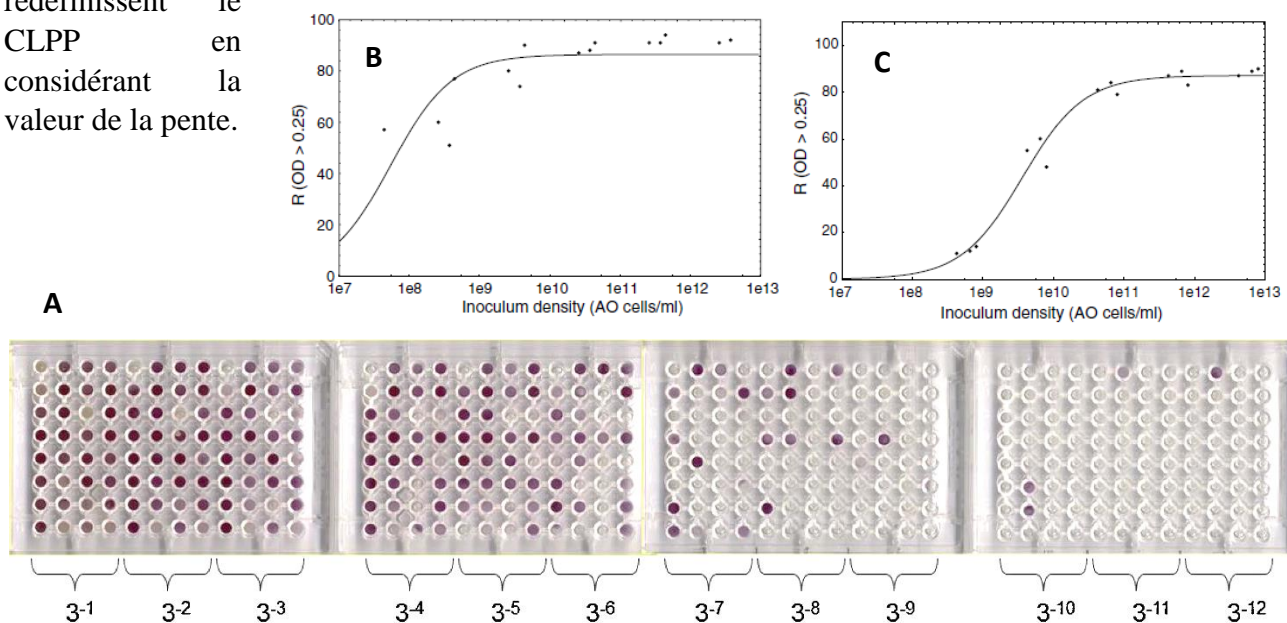
## Analyses statistiques et résultats

La lecture d'une plaque dans son ensemble révèle d'abord le CLPP. Il permet de caractériser l'ensemble du profil métabolique donc d'avoir une interprétation rapide de quelles pratiques agricoles induit le plus de variation dans une communauté bactérienne. Pour étudier la diversité fonctionnelle d'une communauté on prendra en compte les valeurs d'absorbance des puits. Ces valeurs sont corrigées par la soustraction du fond (puits de contrôle). Un test est considéré positif lorsque la valeur de sa densité optique est encore positive et supérieure à 0.25 après correction (**Annexe 2**). Les tests négatifs sont ramenés à la valeur de zéro (Stefanowicz *et al.*, 2006). On calculera aussi l'AWCD qui représente le développement moyen de la couleur des puits, soit l'activité métabolique moyenne des bactéries de cet échantillon (**Annexe 2**). Elle se mesure à travers une cinétique au cours de l'incubation, mais comme elle parvient à saturation à terme, elle peut se calculer après un temps d'incubation spécifique (Harcha *et al.*, 1997). L'AWCD peut être calculée pour chaque guildes de substrats (Kela *et al.*, 2009 ; Grypta *et al.*, 2014). Deux paramètres définissent la

diversité de la réponse : la richesse et la régularité. La richesse fonctionnelle de la communauté (RF), qui correspond à la somme de puits positifs, représente un premier indice de richesse (**Annexe 2**). Mais elle peut aussi être déterminée via l'indice de diversité de Shannon (H) (Stefanowicz *et al.*, 2006 ; Nair *et al.*, 2012 ; Muñiz *et al.*, 2014) (**Annexe 2**). Plus H est élevé plus la communauté est capable de dégrader une diversité de substrat. H peut aussi être mesuré en cinétique et être regroupé par guildes de substrats (Rosa Pino-Otin *et al.*, 2017). La régularité représente la variation de l'intensité de la couleur entre les puits et peut être déterminée à partir de l'indice d'Équitabilité de Pielou's. Cet indice varie de 0 à 1, plus il tend vers 1 plus l'utilisation des substrats est homogène (Nair *et al.*, 2012 ; Gryta *et al.*, 2014 ; Feigl *et al.*, 2017) (**Annexe 2**). Il est aussi possible d'utiliser une variante du coefficient de Gini pour quantifier l'inégale utilisation des sources de carbone (Harcha *et al.*, 1997 ; Yu *et al.*, 2012) (**Annexe 2**).

Ainsi, à partir des Eco-plates il est possible de réaliser, pour chaque plaque des analyses univariées ; CLPP, AWCD, RF, Shannon ; mais aussi multivariées. La plus utilisée reste l'ACP mais il est aussi possible de réaliser une analyse canonique des corrélations (Stefanowicz *et al.*, 2006).

Par ailleurs, diverses approches se sont développées sur le principe de « dilution-d'extinction » pour obtenir des résultats indépendamment de la densité cellulaire de l'inoculum. Rutgers *et al.* (2016), proposent alors d'incuber autant de plaques que de dilutions pour tracer ces courbes de dilution-extinction à partir de l'AWCD (Fig.2). Ils préconisent de diluer de 0 à -11 les sols minéraux et de 0 à -12 les sols organiques juste après le prélèvement. A partir de ces courbes ils redéfinissent le CLPP en considérant la valeur de la pente.



**Figure 2** : Illustration de la relation entre le nombre de puits positifs (RF) et la densité de l'inoculum **B** : prairie naturelle, **C** : champ en conventionnel (Gomez E. d. et al, 2004) **A** : Illustrations de la modification du pattern de couleurs obtenu par l'approche de « dilution-extinction » via 4 Eco-plates pour un inoculum de sol organique. (Rutgers *et al.*, 2016)

Dumontet *et al.* (2017) proposent ; à partir de l'hypothèse de départ que plus la microflore est riche et stable, plus elle conservera ses caractéristiques métaboliques à travers une série de dilution ; de calculer la probabilité de l'évènement « *p* » correspondant à la capacité d'oxydation du substrat à l'aide d'une loi binomiale et de les comparer entre chaque échantillon : plus « *p* » reste élevé à travers les dilutions, plus la population diversifiée.

L'impact de pratiques agricoles a pu être mesuré à l'aide des Eco-Plates. Floch *et al.* (2011) ont pu identifier quel type d'activité fonctionnelle était la plus altérée par des pesticides. Les 6 premiers mois, les amines/amides et les polymères étaient les plus affectés alors que les autres guildes de substrats l'étaient moins. Au-delà de ces 6 mois cependant, toutes les guildes de substrats

étaient affectées. Par ailleurs, Yin *et al.* (2014) et Wei *et al.* (2011) ont pu montrer que plus un sol était avancé dans un processus de végétalisation, plus la communauté bactérienne possédait une diversité métabolique importante (**Annexe 3**). De plus, ces deux études ont montré que les amines/amides, les polymères et les composés phénoliques étaient les activités les plus sensibles à ces différences entre ces milieux. De plus, l'application de différents engrais, l'utilisation des sources de carbone varierait également. Chakraborty *et al.*, (2011) dans un contexte tropical en Inde, montrent par exemple qu'un apport de fumier couplé à une fertilisation minérale stimule l'utilisation des hydrates de carbone mais que l'utilisation des polymères, acides aminés et amines / amides étaient similaires voire inférieurs au sol témoin non traité. Nair *et al.*, (2012) montrent aussi l'effet d'un couvert végétal et de l'application de composts, ces deux pratiques augmentant la diversité fonctionnelle des communautés.

## Les limites

Le principal reproche fait à l'Eco-Plate est que ses conditions d'incubations ne sont pas celles du sol. Il se peut que ce métabolisme ne puisse pas s'exprimer dans le contexte naturel. De plus, l'apport d'une seule source de carbone à la fois induit en effet une pression de sélection vis-à-vis du substrat en faveur de celles ayant un métabolisme rapide supportant une forte concentration en un seul nutriment (Garland *et al.*, 1997 ; Preston-Mafham *et al.*, 2002 ; Muñiz *et al.*, 2014). Le CLPP pourrait donc ne refléter que la capacité d'une communauté bactérienne à supporter les conditions de la plaque : des bactéries capables d'intégrer ce sel de tétrazolium dans leur chaîne respiratoire, qu'elles soient cultivables ou non, mais ayant un métabolisme rapide et aérobie, (Winding *et al.*, 1997 ; Preston-Mafham *et al.*, 2002). D'un puits à l'autre, la diversité n'est donc pas la même et elle diminue par rapport à la communauté inoculée (Garland *et al.*, 1997).

De plus, alors qu'ils représentent des organismes très actifs dans les sols, les champignons ne sont pas représentés dans les Eco-Plates car ce sel de tétrazolium n'est pas adapté à leur métabolisme. Il existe cependant la plaque Biolog FF adaptée pour les étudier (Preston-Mafham *et al.*, 2002).

## Conclusion

La technique de l'Eco-plate avait été introduite dans les études écologiques comme étant un outil pour caractériser les fonctions métaboliques d'une communauté bactérienne. Mais la sélection que la plaque opère sur la communauté inoculée étant trop importante, elle ne permet pas de caractériser rigoureusement ces fonctions mais plutôt d'approcher facilement le potentiel métabolique d'une communauté et la diversité des fonctions qu'elle possède. Ce biais de sélection s'appliquant sur l'ensemble des échantillons étudiés, cela a permis aux Eco-plates de devenir un outil facile et rapide pour comparer des profils d'activités potentielles des communautés bactériennes entre différents types de sols. Des sols de nature différente peuvent ainsi être comparés (Rutgers *et al.*, 2016 ; XUE *et al.*, 2008 ), un même type de sol au cours du temps (Siles *et al.*, 2016), notamment pour suivre l'évolution d'une revégétalisation. Les Eco-plates permettent aussi d'évaluer le caractère polluant de substances contenues dans des engrais (résidus pharmaceutiques dans des boues de stations d'épuration (Rosa Pino-Otin *et al.*, 2017)), mais aussi l'impact de différents engrais sur la richesse fonctionnelle bactérienne des agrosystèmes (Chakraborty *et al.*, 2011 ; Nair *et al.*, 2012). Dans le cadre du projet SECuRE, les Eco-plates peuvent ainsi s'avérer être un outil pratique dans la mesure où elles fournissent une information sur la capacité de la communauté bactérienne à dégrader un large panel de substrat : plus les pratiques favorisent une diversité fonctionnelle aux champs nécessaire à la restauration des sols, plus la probabilité que la CLPP soit élevée augmente. Néanmoins les résultats devront être interprétés avec parcimonie, sans perdre de vue l'approche comparative dans la mesure où ce CLPP reflète qu'un potentiel métabolique.

## Références

- Adriano Sofo, A. M. (2014). Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance. Academic Press.
- Ameryckx, J. (1957). Pedologie, Symposium sur les méthodes d'études microbiologique du sol. Belgique .
- Calbrix, R. (2005). Analysis of the potential functional diversity of the bacterial community in soil : a reproducible procedure using sole-carbon-source utilization profiles. *European Journal of Soil Biology*.
- Campbell, C. (1997). Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests discriminate soil microbial communities . *Journal of Microbiological Methods* .
- Chakraborty, A., Chakrabarti, K., & Ghosh, S. (2011). Effect of long-term fertilizers and manure application biomass and microbial activity of a tropical agriculture soil. *Biology and Fertility of Soils*, 227-233.
- Dumontet, S. (2017). Metabolic and genetic patterns of soil microbial communities in response to different amendements under organic farming system. *Geoderma* .
- Feigl, V. (2017). Influence of red mud in soil microbial communities : Application and comprehensive evaluation of the Biolog EcoPlate approach as a tool in soil microbiological studies . *Science of the Total Environment*, 903-911.
- Floch, C. (2011). Indicators of pesticide contamination : Soil enzyme compared to functional diversity of bacterial communities via Biolog Ecoplates. *European Journal of Soil Biology*, 256-263.
- Garland, J. L. (1997). Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* , 289-300.
- Garland, J. L. (1999). Dilution/extinction of community phenotypic characters to estimate relative structural diversity in mixed communities . *FEMS Microbiology Ecology* , 333-343.
- Girvan, M. S. (2002). Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *American Society for Microbiology* .
- Gomez, E. (2014). Reproducibility in the response of soil bacterial community-level physiological profiles from a land use intensification gradient. *Applied Soil Ecology*.
- Gomez, E. d. (2004). Microbial structural diversity estimated by dilution-extinction of phenotypics traits and T-RFLP analysis along a land-use intensification gradient. *FEMS Microbiology Ecology* , 253-259.
- Gryta, A. (2014). The Application of the Biolog EcoPlate Approach in Ecotoxicological Evaluation of Dairy Sewage Sludge. *Appl Biochem Biotechnol*.
- Harcha, B. (1997). Using the Gini coefficient with BIOLOG substrate utilisation data to provide an alternative quantitative measure for comparing bacterial soil communities. *Journal of Microbiological Methods* , 91-101.

- Kela, P. (2009). One-Dimensional metric for tracking bacterial community divergence using sole carbon source utilization patterns. *Journal of Microbiological Methods*.
- Klimek, B. (2015). Covariation of soil bacteria functional diversity and vegetation diversity along an altitudinal climatic gradient in the western carpathians . *Pedobiologia*.
- Margesin, R. (2017). Microbiology meets archaeology : soil microbial communities reveal different human activities at archaic monte iato. *Soil microbiology*.
- Mondini, C. (2003). Community level physiological profiling as a tool to evaluate compost maturity : a kinetic approach. *European journal of soil biology*.
- Muñiz, S. (2014). Analysis of the diversity of substrate utilisation of soil bacteria exposed to Cd and earthworm activity using generalised additive models. *Journal of Microbiologie Methods* .
- Nair, A. (2012). Soil microbial biomass, functional microbial diversity, and nematode community structure as affected by cover crops and compost in an organic vegetable production system. *Applied Soil Ecology* , 45 - 55.
- Nurulita, Y. (2016). Restoration of tropical peat soils : the application of soil microbiology for monitoring the success of the restoration process. *Agriculture, Ecosysteme & Environment*.
- Pennanen. (2001). Microbial communities in boreal coniferous forest humus exposed to heavy metals and changes in soil pH— a summary of the use of phospholipid fatty acids, Biolog® and 3H-thymidine incorporation methods in field studies. *Geoderma* .
- Pierce, M. L. (2014). False positives in Biolog EcoPlates™ and MT2 MicroPlates™ caused by calcium . *Journal of Microbiological Methods* .
- Preston-Mafham. (2002). Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles – a critique. *FEMS Microbiology Ecology*.
- Ros, M. (2006). Log-term effects of compost amendment of soil on functional and structural diversity and microbial activity . *Soil Use and Management* , 209-218.
- Rosa Pino-Otin, M. (2017). Effects of 18 pharmaceuticals on the physiological diversity of edaphic microorganisms . *Science of The Total Environment*.
- Rutgers, M. (2016). Monitoring soil bacteria with community-level physiological profiles using Biolog™ ECO-plates in the Netherlands and Europe. *Applied Soil Ecology*.
- S.Kvas. (2017). Development of microbial test suite and data integration methode for assessing microbial health of contaminated soil. *Journal of Microbiologie Methods*.
- Shishidoa, M. (1998). Storage effects on indigenous soil microbial communities and PGPR efficacy. *Soil Biology and Biochemistry* , 939-947.
- Siles, J. A. (2014). Microbial diversity of a mediterranean soil and its changes after biotransformed dry olive residue amendment . *PLOS on* .
- Siles, J. A. (2016). Effect of altitude and season on microbial activity, abundance and community structure in Alpine forest soils. *FEMS microbiology ecology*.



- Stefanowicz. (2006). The Biolog Plates Technique as a Tool in Ecological Studies of Microbial *Polish Journal of Environmental Studies* .
- Tachon, S. (2009). Experimental conditions affects the site of tetrazolium violet reduction in the electron chain of *Lactococcus lactis*. *Microbiology* , 1.
- WEI, Y. (2011). Relationship between vegetation restoration and soil microbial characteristic in degraded karst regions : a case study. *Pedosphere*.
- Winding, A. (1997). Biolog Substrate Utilisation Assay for Metabolic Fingerprints of Soil Bacteria : Incubation Effects. *Microbial Communities* .
- Xu, W. (2015). Application and optimization of Biolog Ecoplates in functional diversity studies of soil microbial communities. *EDP Science*.
- XUE, D. (2008). Soil Microbial Community Structure in Diverse Land Systems : a comparative study using Biolog, DGGE and PLFA analyses . *Pedosphere*, 653-663.
- Yin, R. (2014). Vegetation type affects soil enzyme activities and microbial functional diversity following re-vegetation of a severely eroded red soil in sub-tropical China. *CATENA*.
- Yu, Y. (2012). Shift in microbial community function and structure along the successional gradient of coastal wetlands in Yellow River Estuary . *European Journal of Soil Biology* .

## Annexes

### Annexe 1 : Nature des substrats contenus dans l'Eco-plate

**Tableau 1** : Guide des différentes sources de carbones de l'Eco-plate présent dans une série :

Carbohydate, carboxylic and ketonic acid, amine/amide , polymers, amino acide

(Grypta et al., 2014)

<b>A1</b> Water	<b>A2</b> $\beta$ -Methyl-D-Glucoside	<b>A3</b> D-Galactonic acid- $\gamma$ -lactone	<b>A4</b> L-Arginine
<b>B1</b> Pyruvic Acid Methyl Ester	<b>B2</b> D-Xylose	<b>B3</b> d-Galacturonic acid	<b>B4</b> L-Asparagine
<b>C1</b> Tween 40	<b>C2</b> i-Erythritol	<b>C3</b> 2-Hydroxybenzoic acid	<b>C4</b> L-Phenylalanine
<b>D1</b> Tween 80	<b>D2</b> d-Mannitol	<b>D3</b> 4-Hydroxybenzoic acid	<b>D4</b> L-Serine
<b>E1</b> $\alpha$ -cyclodextrin	<b>E2</b> N-Acetyl-d-glucosamine	<b>E3</b> $\gamma$ -Hydroxybutyric acid	<b>E4</b> L-Threonine
<b>F1</b> Glycogen	<b>F2</b> D-Glucosaminic acid	<b>F3</b> Itaconic acid	<b>F4</b> Glycyl-L-glutamic acid
<b>G1</b> D-Cellobiose	<b>G2</b> Glucose-1-phosphate	<b>G3</b> $\alpha$ -Ketobutyric acid	<b>G4</b> Phenylethylamine
<b>H1</b> $\alpha$ -D-Lactose	<b>H2</b> D,l- $\alpha$ -Glycerol phosphate	<b>H3</b> d-Malic acid	<b>H4</b> Putrescine

## Annexe 2 : Détails des calculs des analyses statistiques réalisables à partir de l'Eco-plate

### 1) Average Well Color Development, AWCD :

$$AWCD = \frac{\sum_{l=1}^{n=N} ODc}{N} = \sum \frac{ODc}{31}$$

où N = 93 (3\*31) (S.Kvas *et al.*, 2017) ou 31 (XUE *et al.*, 2008 ; Nair *et al.*, 2012)

### 2) Richesse fonctionnelle, RF :

$$RF = \sum (ODc > 0,25)$$

### 3) Indice de Shannon, H :

$$H = - \sum_{i=1}^N pi \ln pi$$

où pi correspond à la proportion de l'activité microbienne totale sur une source de carbone particulière pour un substrat i donné, N est le nombre de substrats par plaque (ici 31).

### 4) Equitabilité de Pielou's :

$$E = \frac{H}{\ln S}$$

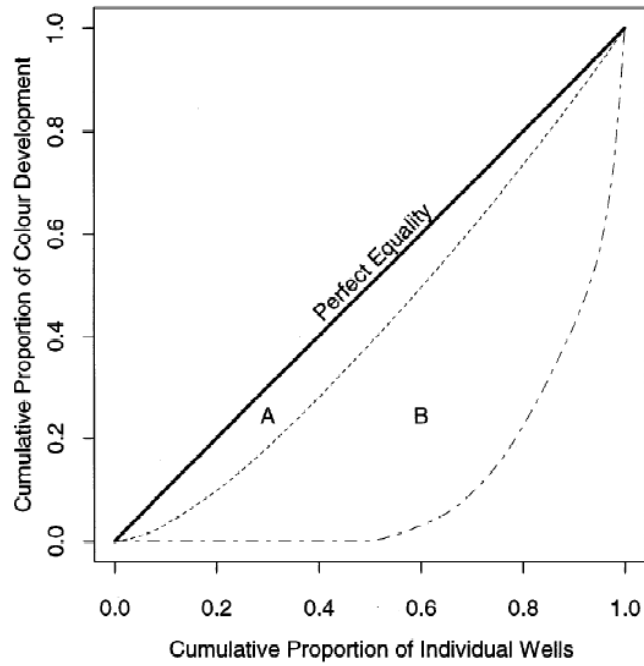
où H = la diversité de Shannon et S = nombre de puits positifs (soit RF).

### 5) Le coefficient de Gini de la courbe de Lorenz (Fig.3) :

$$G = \frac{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N |x_i - x_j|}{2 * N^2 * AWCD}$$

où N = nombre de substrats (31),  $x_i$  et  $x_j$  sont la valeur d'absorbance (ODc) des puits. Le coefficient de Gini varie de 0 à 1, 0 représentant une égalité parfaite et 1 une inégalité parfaite. Par exemple, si nous avons une plaque avec 2 substrats dont les valeurs d'ODc sont : Puits 1 = 0,3 et Puits 2 = 0,5. Le coefficient de Gini sera de 0,125 :

$$G = \frac{|0,3 - 0,3| + |0,3 - 0,5| + |0,5 - 0,5| + |0,5 - 0,3|}{2 * 2^2 * \left[\frac{0,3 + 0,5}{2}\right]} = 0,125$$



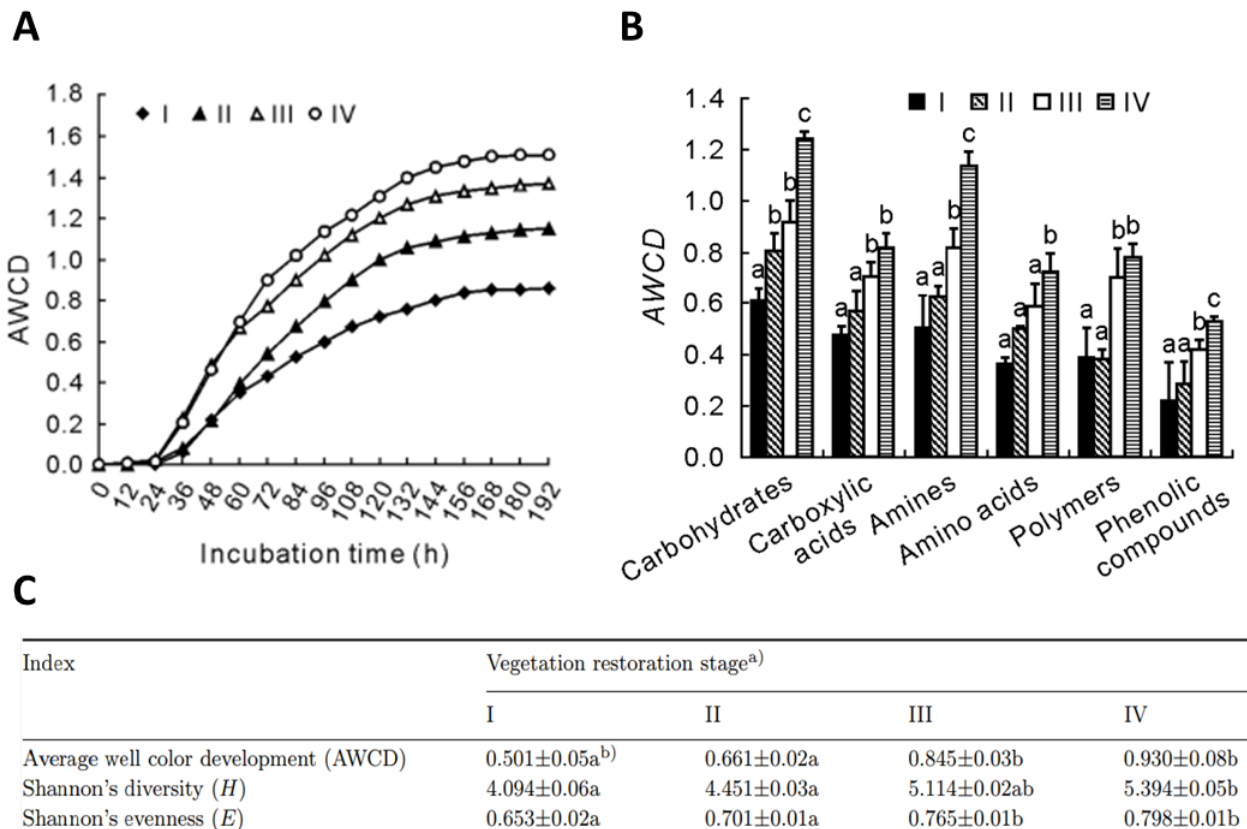
**Figure 3** : Exemple de courbes de Lorenz, adaptées aux Eco-plates. La droite ( $x=y$ ) représente une égalité parfaite, tous les puits de la plaque sont positifs et ont la même absorbance. La courbe de Lorenz A a un faible coefficient de Gini et donc une grande diversité de fonction. Alors que la courbe B a un coefficient de Gini élevé et donc une faible diversité de fonction : peu de fonctions représentent la majorité de l'absorbance. (Harcha et al., 1997)

## 6) Loi Binomial

$$Binomial(x, n, p) = \sum_{y=x}^n Binomial(y, n, p)$$

où  $n$  est le nombre totale de tests effectués,  $y$  le nombre total de test ayant obtenus un résultats positif (ici les ODC négative sont  $< 0,06$  et aussi ramené à 0) et  $p$  la probabilité que chaque test obtienne un résultats positifs (ici  $p = 0,5$ ).

**Annexe 3 : Illustrations des résultats de Wei *et al.*, 2011**



**Figure 4 : résultats obtenus par Wei *et al.*, (2011) sur 4 sols au stade de végétalisation différents I = stade terre nue, II = stade de communauté herbacée, III = stade de communauté arbustive, IV= stade de communauté arborescente**

**A :** AWCD<sub>590nm</sub> au cours du temps d'incubation. On peut observer que plus le sol est végétalisé plus la communauté bactérienne présente un AWCD important. Cela traduit que les communautés bactériennes des sols plus avancés dans les processus de revégétalisation ont une utilisation moyenne des substrats plus importante.

**B :** AWCD<sub>590nm</sub> au temps d'incubation 72h (Ti) pour chaque guildes de substrat. On remarque que les activités métaboliques associées à chaque guildes sont relativement les mêmes entre un sol nu et herbacé (hormis les carbohydrates), mais qu'elles augmentent plus le processus de revégétalisation est avancé.

**C :** AWCD<sub>590nm</sub> et les indices de diversité *H* et *E*, au Ti = 72h. Là aussi la diversité et la régularité de la réponse métabolique des communautés sont significativement plus importantes à partir du stade arbustif.

Le choix des données au Ti = 72h pour l'étude statistique n'est pas justifié mais probablement que ce temps a été choisi car c'est à partir de là que les AWCD deviennent significativement différentes entre les échantillons.