

République algérienne démocratique et populaire

*Ministère de l'enseignement supérieur
et de la recherche scientifique*

Université BADJI Mokhtar

Faculté des Sciences

*Département de Biochimie
Année 2006-2007*

Mémoire de Magistère

Option : Microbiologie de l'environnement



Vue aérienne de la Camargue

**Impact de différents régimes hydriques sur la capacité de
dénitrification et de respiration des communautés
microbiennes d'un étang de Camargue**

ALLIOUCH-KERBOUA Chérifa

Membres du jury :

M^{me} BOUTEFNOUCHET N.
M^{me} GACEMI KIRANE D.
M^r MERAD T.
M^{me} CHETIBI H.

Présidente PR. U. d'Annaba
Rapporteur PR. U. d'Annaba
Examineur M. C. U. d'Annaba
Examinatrice M. C. U. d'Annaba

République algérienne démocratique et populaire

*Ministère de l'enseignement supérieur
et de la recherche scientifique*



Université BADJI Mokhtar



Faculté des Sciences

*Département de Biochimie
Année 2006-2007*

Mémoire de Magistère

Option : Microbiologie de l'environnement



Vue aérienne de la Camargue

**Impact de différents régimes hydriques sur la capacité de
dénitrification et de respiration des communautés microbiennes
d'un étang de Camargue**

ALLIOUCH-KERBOUA Chérifa

Membres du jury :

M^{me} BOUTEFNOUCHET N.
M^{me} GACEMI KIRANE D.
M^r MERAD T.
M^{me} CHETIBI H.

Présidente PR. U. d'Annaba
Rapporteur PR. U. d'Annaba
Examineur M. C. U. d'Annaba
Examinatrice

Remerciements

Je remercie ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la force pour réaliser ce travail.

Je remercie vivement Madame Gacemi Kirane D. mon encadreur pour son encouragement, sa confiance et ses conseils.

Je remercie également Madame Boutefnouchet N. professeur de microbiologie à l'université d'Annaba pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ma soutenance.

Monsieur Mérad T. Maître de conférence de l'université d'Annaba et Madame Chétibi H.

Maître de conférence de l'université d'Annaba d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Enfin, je remercie tout ceux qui ont contribué de près ou de loin, ou de quelque manière, que ce soit, à la réalisation de ce mémoire.

Dédicace

A mes chers parents, qui m'ont toujours soutenue. A mon frère et mes sœurs.

A toutes ma famille. A toutes mes amies. A tous mes maîtres.

Résumé

Les zones humides sont des écosystèmes très riches, vu la biodiversité importante qu'elles hébergent. Elles sont aussi considérées comme des écosystèmes très vulnérables, car particulièrement affectés par les fortes pressions climatiques et démographiques actuelles. Dans notre étude, nous avons cherché à évaluer dans quelle mesure l'application de différentes conditions hydriques peut affecter les fonctions microbiennes de respiration et de dénitrification (responsables respectivement d'émissions de CO₂ et de N₂O) dans deux lots de sédiment provenant d'un même étang de Camargue, l'un prélevé dans une zone qui connaît des alternances inondation /exondation (A) et l'autre dans une zone qui est toute l'année sous eau (B). Ces deux lots de sédiment ont été soumis à trois traitements différents : maintenus saturés en eau durant toute la durée de l'expérience (2 mois), soumis à une dessiccation progressive puis laissés secs jusqu'à la fin de l'expérience, ou encore soumis à une alternance dessiccation – réhumectation – dessiccation. Les potentiels de dénitrification et de respiration ont été affectés par les conditions hydriques appliquées lors de l'expérience mais les sédiments A et B ont répondu différemment, suggérant que l'histoire du sédiment conditionne sa réponse à un stress tel que l'assèchement. Les potentiels de dénitrification et de respiration sont restés relativement stables au cours du temps pour les deux sédiments maintenus sous eau. En revanche, l'assèchement expérimental a entraîné une diminution du potentiel de respiration pour les deux sédiments. Par contre, les deux sédiments ont montré des réponses différentes quant à l'évolution du potentiel de dénitrification. La réhumectation du sédiment en cours d'incubation s'est traduite par une stimulation du potentiel de dénitrification alors que la respiration aérobie semblait ne pas répondre à ce retour à des conditions favorables. Par ailleurs, la diversité métabolique des communautés microbiennes des sédiments diminuait sensiblement (en termes du nombre de substrats métabolisés) suite à l'assèchement expérimental, l'origine et les caractéristiques du sédiment conditionnant cette réponse, notamment lors du traitement d'alternance.

Mots clés : Zones humides, fonctions microbiennes, conditions hydriques, communauté microbienne, sédiment.

Abstract

Wetlands are very rich ecosystems, according to the important biodiversity that they contain. They are also considered as very vulnerable ecosystems, because particularly affected by the strong present climatic changes and demographic pressures. In our study, we tried to assess in what extent the application of different water conditions affect the microbial functions of aerobic respiration and denitrification (respectively responsible for the emission of two greenhouse effect gases: CO₂ and N₂O). Two pools of sediments coming from the same semi-permanent pond in Camargue were used, one sampled in a zone that knows frequent flooding / exondation alternations (A), and the other sampled in a zone that is under water during the whole year (B). These two pools of sediment were submitted to three different treatments: maintained water-saturated during the whole length of the experiment (2 months), submitted to a progressive desiccation until the end of the experiment, or submitted to a desiccation- rewetting-desiccation alternation. The potentials of denitrification and respiration were affected by the water conditions applied during the experiment but sediments A and B responded differently, suggesting that the history of the sediment conditions its answer to the desiccation. Denitrification and respiration potentials remained relatively steady during the experiment for the two sediments maintained under water. The experimental desiccation entailed a reduction of the respiration potential for the two sediments, but these latter displayed different answers regarding the evolution of the denitrification potential. The rewetting of the sediment at mid-incubation resulted in a stimulation of the denitrification, whereas the aerobic respiration potential did not seem to answer. Otherwise, the metabolic diversity of the microbial communities in the sediments decreased appreciably following the experimental desiccation, the origin and the physico-chemical features of the sediment conditioning this answer, notably at the time alternation.

Keywords: Wetlands, microbial functions, water conditions, microbial community, sediment.

ملخص

تعتبر المناطق الرطبة أنظمة بيئية جد غنية، نظرا للتنوع البيولوجي الذي تحتويه، و لكنها أيضا أنظمة بيئية مهددة لأنها تعاني من الضغوط المناخية و الديمغرافية الحالية. حاولنا في دراستنا أن نبحث عن تأثير عدة أنظمة ري على العمليات البكتيرية التنفس و dénitrification (المسؤلان عن طرح CO₂ و N₂O) في مجموعتين من الرواسب اللتان استخرجتا من مستنقع في منطقة la Camargue واحدة استخرجت من منطقة فيها تناوب بين فترات يكون فيها المستنقع مغمورا بالمياه و أخرى يكون فيها جاف المنطقة (A). أما الأخرى فقد استخرجت من منطقة مغمورة بالمياه طوال السنة المنطقة (B) أخضعنا هاتان المجموعتان من الرواسب إلى 3 أنظمة ري مختلفة :

- في الأول حرصنا على أن يبقى الراسب مغمورا بالماء طيلة التجربة (شهرين)

- في الثاني حرصنا على التجفيف التدريجي ثم تركنا الراسب يجف تماما حتى نهاية التجربة

- في الثالث تعاقبت ثلاث فترات على الراسب: التجفيف - إعادة الترطيب - التجفيف.

إن إمكانيات عمليتي dénitrification و التنفس تأثرت بأنظمة الري الثلاث المطبقة خلال التجربة و لكن الراسبين B و A تجاوبا مع الأنظمة بشكل مختلف، مقترحة بأن تاريخ الراسب يؤثر في تجاوبه مع stress كالتجفيف الذي مرسناه. إمكانيات عمليتي dénitrification و التنفس بقيت ثابتة بشكل نسبي خلال فترة التجربة بالنسبة للراسبين المغمورين بالمياه.

في المقابل التجفيف التجريبي أدى إلى انخفاض إمكانيات عملية التنفس في الراسبين. و لكن الراسبين أظهرتا تجاوبا مختلفا بالنسبة لتطور إمكانيات عملية dénitrification. ترطيب الراسب خلال فترة الحضان أدى إلى تنشيط إمكانيات عملية dénitrification، بينما كان يبدو أن التنفس الهوائي لا يتجاوب مع العودة إلى الشروط الملائمة.

زد على ذلك التنوع الأيضي بمجموعات البكتيرية الموجودة بالرواسب كان ينقص بشكل ضعيف (و هذا بالنسبة لعدد المكونات المؤيضة) بعد التجفيف التجريبي، إن أصل و مميزات الراسب هو الذي يتحكم في هذا التجاوب، لا سيما خلال نظام الري بالتعاقب.

الكلمات المفتاحية : المناطق الرطبة، عمليات بكتيرية، أنظمة ري، مجموعات بكتيرية، راسب.

Liste des tableaux

Tab.	Titres	Pages
1	Caractéristiques du sédiment A et du sédiment B	13
2	Niveau d'utilisation des substrats Biolog Ecoplates	30

Liste des figures

Fig.	Titres	Pages
1	Carte des Zones humides de la Camargue	11
2	Baisse salée en été, 11 Août 2005	12
3	Baisse salée en hiver, Avril 2005	12
4	Taux d'humidité dans le sédiment	22
5	Teneurs en Carbone et en Azote total dans le sédiment par la méthode CHN	24
6	ACP obtenue à partir des spectres de la NIRS	25
7	Teneurs en nitrate dans le sédiment	26
8	Evolution de l'activité de dénitrification potentielle du sédiment	27
9	Evolution de l'activité de respiration potentielle du sédiment	29
10	Evolution de la diversité métabolique du sédiment	32

Liste des abréviations

nm : nanomètre

p ≤ 0,05 : probabilité ≤ 0,05

TSA : Tryptic Soy Agar

UFC : unité formant colonie

Sommaire

I- Introduction	1
II- Matériels et méthodes	11
II.1- Présentation de la Camargue et du site d'étude	11
II.1.1- Situation géographique	11
II.1.2- Site d'étude	12
II.1.3- Caractéristiques du sédiment	13
II.2- Conditions d'incubation des échantillons	13
II.3- Analyses réalisées	15
II.3.1 - Détermination de la teneur en eau du sédiment	15
II.3.2 - Analyses des teneurs en C et N total (CHN) et de la qualité biochimique de la M.O	15
II.3.3 – Détermination de la teneur en nitrate	16
Préparation des échantillons	16
Mesure du taux de Nitrate	17
II.3.4- Analyses des fonctions microbiennes	17
II.3.4.1- Dénitrification potentielle	17
II.3.4.2- Respiration potentielle (Substrate induced respiration : SIR)	18
II.3.5- Analyses de la diversité microbienne	19
II.4- Tests statistiques	20
III- Résultats	21
III.1- Evolution des variables physico-chimiques du sédiment	22

III.1.1- Taux d'humidité	22
III.1.2- Teneurs en Carbone et en Azote	23
Teneurs en Carbone et en Azote par la méthode CHN	23
Caractéristique de la matière organique (méthode NIRS)	25
III.1.3- Teneurs en nitrate dans le sédiment	25
III.2- Evolution des variables biologiques du sédiment	27
III.2.1- Evolution de la dénitrification potentielle	27
III.2.2- Evolution de la respiration potentielle	28
III.2.3- La diversité microbienne	29
IV- Discussion	33
IV.1-Evolution de la teneur en nitrates	33
IV.2- Evolution comparée de la dénitrification potentielle et de la teneur en nitrate des sédiments	34
IV.3- Evolution comparée de la respiration potentielle et de la diversité fonctionnelle	36
IV-4 Comparaison des deux sédiments	38
V- Conclusion et Perspectives	40
Glossaire	43
Bibliographie	45

I- Introduction

L'impact des activités humaines sur les écosystèmes devient de plus en plus important (on estime qu'à l'heure actuelle, plus de 60% des éco- ou anthroposystèmes ont déjà été altérés de façon très préoccupante – Suzuki, 2005). La pression démographique, donc les besoins croissants en ressources (Sala *et al.*, 2000) génèrent des modifications du climat et des changements massifs de l'usage des territoires. Les conséquences en cascade de ces bouleversements risquent de mettre en péril les services de tous types (socio-économiques, culturels, environnementaux) rendus par « les systèmes supportant la vie » (« Earth's life-support systems » - Rosimeiry & Rademacher, 2001 ; Stokstad, 2005). En ce qui concerne les services environnementaux dont l'un des aspects est l'équilibre des cycles biogéochimiques, notamment l'équilibre des échanges biosphère - atmosphère, il n'est encore pas clairement établi si les changements évoqués vont avoir pour conséquence d'atténuer ou, au contraire, d'accélérer les processus biotiques à l'origine des altérations comme, par exemple, les émissions de gaz à effet de serre. Ces gaz à effet de serre s'accumulent dans l'atmosphère et sont capables d'absorber les radiations infra rouges qui entraînent une augmentation de la température atmosphérique (Houghton, 1997). Parmi les principaux gaz à effet de serre, on trouve le CO₂, CH₄, N₂O (Houghton *et al.*, 1996 ; Khalil *et al.*, 2005). Chacun de ces gaz a différentes sources, comportement spectral, temps de résidence dans l'atmosphère et type de puits.

Les cycles biogéochimiques sont l'ensemble des transformations chimiques cycliques qui intéressent tous les éléments qui constituent la matière vivante, c'est-à-dire les composés du carbone, les substances azotées, les composés soufrés, phosphorés, etc... Ils s'effectuent dans une petite partie de la planète : La biosphère et qui comprend les océans, la surface des continents dans sa partie la plus superficielle (sol) et la partie inférieure de l'atmosphère (Leclerc *et al.*, 1977 ; Schimel, 1995). Ils sont donc primordiaux pour l'équilibre et la pérennité de la vie sur terre. Ces cycles biogéochimiques ont

évolués avec l'apparition d'espèces nouvelles et ils sont également influencés par les activités humaines industrielles et militaires (Perry *et al.*, 2004).

Les cycles qui intéressent notre étude sont **les cycles du Carbone et de l'Azote**. Ces deux cycles sont respectivement responsables d'émission de CO₂ et de N₂O.

Le cycle du carbone comprend deux étapes :

- 1) La réduction du gaz carbonique et formation de carbone organique,
- 2) Formation de gaz carbonique et oxydation du carbone organique

L'importance de ce cycle mérite qu'on reprenne ces étapes plus en détail.

1) La réduction du gaz carbonique et formation de carbone organique :

Le carbone, sous forme oxydée, comprend le CO₂ atmosphérique, les carbonates, et bicarbonates dissous dans les océans et les eaux douces de surface. La concentration du CO₂ atmosphérique est maintenue constante grâce à l'équilibre établi entre les processus d'assimilation (photosynthèse) et les processus inverses de production (respiration ou combustion). Les eaux jouent à cet égard un rôle tampon puisqu'elles peuvent dissoudre le CO₂ atmosphérique en grande quantité. Elles le gardent en réserve et peuvent le restituer pour maintenir cet équilibre.

La transformation du CO₂ en composés organiques est assurée en premier lieu par l'activité photosynthétique des plantes vertes.

D'autres organismes vivants y participent également dans une faible mesure, les algues unicellulaires, abondantes dans le sol, les algues marines, les algues des eaux douces dont la prolifération est limitée aux couches d'eaux les plus superficielles et enfin les bactéries photosynthétiques dont le rôle est prédominant dans les océans (Leclerc *et al.*, 1977).

2) Formation de gaz carbonique et oxydation du carbone organique :

La conversion du carbone organique ainsi obtenu à l'état minéralisé est assurée par un processus d'oxydation : c'est la respiration. Sans doute, les plantes elles-mêmes participent à cette transformation,

de même que les animaux. Mais ce sont surtout les micro-organismes qui jouent ici le rôle essentiel. Les composés organiques formés par les animaux et les végétaux retournent à la terre après leur mort. La plus grande partie est végétale ; elle est de nature cellulosique ou ligneuse. De nombreuses bactéries spécialisées, aérobies ou anaérobies vont intervenir pour la décomposer : Le genre *Pseudomonas*, les bactéries cellulolytiques comme *Cytophaga*, les bactéries pectinolytiques, les bactéries dénitrifiantes, les actinomycètes, le genre *Bacillus*. Les produits de cette dégradation, plus difficilement oxydables, constituent l'humus, un des éléments de fertilité du sol.

Cette minéralisation peut également avoir lieu en anaérobiose dans les fonds marins ou les vases des étangs et des rivières, conduisant à des produits comme le méthane, l'hydrogène, l'hydrogène sulfuré et le CO₂. Certains de ces composés réduits tel le méthane ou l'hydrogène sulfuré pourront être ultérieurement oxydés par des bactéries spécialisées.

Parallèlement à ces mécanismes qui assurent la réduction du CO₂ puis sa restauration, se juxtapose le cycle de l'oxygène : au cours de la première étape de photosynthèse, apparaît de l'oxygène moléculaire ; au cours de la seconde, l'oxydation des composés organiques est couplée à la réduction de l'oxygène moléculaire (Leclerc *et al.*, 1977 ; Perry *et al.*, 2004).

Le cycle de l'azote quant à lui comprend quatre étapes :

- 1) Assimilation de l'azote
- 2) Ammonification
- 3) Nitrification
- 4) Dénitrification

Nous allons reprendre ces étapes une à une.

1) Assimilation de l'azote :

L'azote assimilé par les plantes vertes a pour origine principale, l'activité microbienne ; il provient accessoirement des engrais chimiques. Dans les deux cas il est apporté sous forme de nitrate et d'azote moléculaire.

- Les nitrates sont réduits au niveau cellulaire en ammoniac qui est greffé par amination sur des intermédiaires métaboliques avec formation de deux acides aminés principaux : l'acide glutamique et l'acide aspartique. Ces constituants sont alors intégrés dans les chaînes de biosynthèse qui donnent naissance à des composés azotés : protéines et acides nucléiques.
- L'azote atmosphérique peut être assimilé directement grâce à l'intervention de micro-organismes. La fixation de l'azote résulte alors de l'association étroite et indispensable entre la plante et les microbes : « symbiose ». Elle a été particulièrement bien étudiée chez les légumineuses. Les micro-organismes responsables sont des bâtonnets Gram-, mobiles, classés dans le genre *Rhizobium* et présents dans le sol. Ils agissent au niveau des poils absorbants des racines en lésant les parois cellulaires et en pénétrant directement dans la racine. La plante réagit vigoureusement à cette agression en accélérant la division cellulaire à cet endroit et en produisant finalement une excroissance nodulaire qu'on appelle un nodule ou une nodosité. C'est dans ces nodosités que l'azote moléculaire est fixé puis assimilé par la plante. Chaque participant (plante et micro-organisme) tire un profit personnel de cette symbiose. Ni l'un, ni l'autre, pris isolément, n'est capable de fixer l'azote.
- L'azote atmosphérique peut être fixé directement par d'autres micro-organismes. Leur multiplication est à l'origine d'une nouvelle source d'azote protéinique. Ces fixateurs d'azote non symbiotique sont les bactéries du genre *Azotobacter*, certains *Clostridium* et quelques algues bleues. Il ne semble pas que ce phénomène soit de grande importance dans les zones tempérées. Il interviendrait, par contre, assez efficacement dans les régions tropicales en favorisant la fertilité du sol (Leclerc *et al.*, 1977).

2) Ammonification :

Le processus d'ammonification est double. D'une part, les composés azotés organiques d'origine végétale ou animale libérés à la mort de ces organismes sont immédiatement décomposés en ammoniac par les micro-organismes. Ces derniers subissent ultérieurement la même transformation. D'autres part, les animaux excrètent au cours de leur vie une quantité non négligeable de composés azotés : ammoniac chez les vertébrés ; acide urique et urée chez les invertébrés. Là encore, de nombreux

groupes de micro-organismes sont capables de dégrader totalement ces constituants. L'urée, par exemple est hydrolysée en ammoniac et en anhydride carbonique (Leclerc *et al.*, 1977 ; Perry *et al.*, 2004)

3) Nitrification :

Le troisième stade du cycle azoté est la conversion de l'ammoniac en nitrates, c'est-à-dire la nitrification. Il restitue aux plantes cet élément azoté minéral directement assimilable et ferme en partie le cycle. La transformation s'effectue en deux étapes grâce aux bactéries nitrifiantes qui appartiennent surtout aux genres *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosococcus* et *Nitrosolobus*, elles oxydent l'ammoniac en nitrites puis les bactéries appartenant aux genres *Nitrobacter*, *Nitrococcus* et *Nitrocystis* oxydent les nitrites en nitrates (Pelmont, 1995 ; Universalis, 2003)

La nitrification contribue à la fertilité du sol puisque les nitrates constituent le matériel azoté presque unique, utile à la croissance des plantes vertes. Les sols cultivés fertiles sont riches en bactéries nitrifiantes. On peut donc favoriser artificiellement la fertilisation en apportant au sol des engrais nitrates ou en lui fournissant des composés organiques directement transformables en nitrates (Leclerc *et al.*, 1977).

4) Dénitrification :

Il s'agit d'un processus respiratoire s'exprimant en anaérobiose au cours duquel certains microorganismes (essentiellement des bactéries aérobies- anaérobies facultatives) utilisent les nitrates ou les nitrites comme accepteurs final d'électron à la place de l'oxygène. En fin de chaîne de réduction de la dénitrification, des composés gazeux tels que NO (oxyde nitrique), N₂O (oxyde nitreux ou protoxyde d'azote) et N₂ (diazote) sont produits (Tiedje, 1988; Phillipot & Lensi, 1997 ; Firth & Edwards, 1999 ; Germon & Couton, 1999 ; Parry *et al.*, 2001 ; Wigand *et al.*, 2004).

La dénitrification se produit surtout dans des zones humides fermées devenues anaérobies. Parmi les bactéries qui réalisent cette transformation se trouvent différentes espèces de *Pseudomonas* (*Pseudomonas denitrificans*, *Pseudomonas perfectomarinus*, *Pseudomonas stutzeri*), *Thiobacillus*

denitrificans, *Micrococcus denitrificans*, *Paracoccus denitrificans*, *Achromobacter cycloclastes*, *Alcaligenes*, *Bacillus pyocyaneus*, *Corynebacterium*, *Spirillum*, *Xanthomonas* et certaines Entérobactéries comme *Escherichia coli* (Gamble *et al.*, 1977 ; Leclerc *et al.*, 1977 ; Pelmont, 1995 ; Peytavin Cécile & Engasser, 1995 ; Michele *et al.*, 1998 ; Firth & Edwards, 1999 ; Universalis, 2003 ; Perry *et al.*, 2004 ; Phillipot & Hallin, 2005).

Les zones humides sont des écosystèmes qui ont été reconnus très tôt par l'homme pour leurs vertus (Épurateurs naturels vis-à-vis des Nitrates, régulateurs des régimes hydrologiques, protection et stabilisation du trait de côte, sources d'aliments pour l'humanité : riz, poisson) et leurs défauts (Émetteurs de gaz à effet de serre, sources de pathologies pour l'Homme).

Plusieurs définitions ont été proposées pour ces zones. Une définition multicritère qui regroupe plusieurs disciplines : hydrologie, pédologie, biologie, c'est la définition officielle des zones humides au Canada : « Terres qui sont saturées en eau durant de longues périodes et qui favorisent l'apparition de zones humides ou de processus aquatiques, on peut les retrouver dans les régions où les sols sont asséchés, où il y a des végétaux hydrophytiques et divers espèces dont l'activité biologique s'adapte à cet environnement » (Zoltai and Vitt, 1995; Warner & Rubec, 1997).

Une autre définition qui est Monocritère et qui concerne uniquement l'hydrologie, c'est la définition internationale des "zones humides" promulguée dans la Convention de Ramsar sur les zones humides d'importances internationales (Ramsar, Iran, 2.2.1971) : « Au sens de la présente Convention, les zones humides sont des étendues de marais, de fagnes, de tourbières ou d'eaux naturelles ou artificielles, permanentes ou temporaires, où l'eau est stagnante ou courante, douce, saumâtre ou salée, y compris des étendues d'eau marine dont la profondeur à marée basse n'excède pas six mètres ». (Navid, 1989; Finlayson & Moser, 1991 ; ramsar.org/key_conv_f.htm)

Les zones humides sont considérées comme très riches sur le plan environnemental en raison, notamment, de l'importante biodiversité qu'elles hébergent (Fromin *et al.*, 2005). Elles sont aussi

considérées comme des écosystèmes très vulnérables, car particulièrement affectées par les fortes pressions climatiques et démographiques actuelles (Brinson & Alvarez, 2002). Le réchauffement climatique génère, entre autres conséquences, des modifications des régimes de précipitations pouvant entraîner des variations du niveau des mers et des océans. Ces variations seront susceptibles d'affecter fortement les zones humides, et, parmi elles, tout spécialement les zones deltaïques (Pfeifle *et al.*, 2004), telles que la Camargue qui se trouve dans un contexte fortement anthropisé et où de nombreux enjeux antagonistes s'affrontent : Conservation, pêche, chasse, rizières, salins, cultures sèches (Lensi, 2003). Outre les modifications des régimes hydrologiques, les zones humides sont également très vulnérables par rapport aux changements d'utilisation des terres qui résultent de l'accroissement de la pression démographique.

Notre sujet de recherche s'inscrit dans ce contexte général et se situe au sein d'un projet de plus grande ampleur associant quatre laboratoires français et qui concerne l'impact des changements globaux sur le fonctionnement des écosystèmes et, en particulier, sur l'équilibre et le couplage des cycles biogéochimiques en zones humides.

En effet les cycles de l'azote et du carbone sont intimement liés ; pourtant peu d'études ont abordé les mécanismes de ce couplage entre l'évolution de la qualité de la matière organique et la dynamique des communautés microbiennes fonctionnelles responsables des flux de carbone et d'azote gazeux.

La diversité microbienne est souvent considérée comme fonctionnellement redondante ce qui implique que les fonctions des écosystèmes réalisées par les micro-organismes sont contrôlées uniquement par les facteurs abiotiques et les interactions entre les niveaux trophiques (Meyer, 1993 ; Heal *et al.*, 1996).

De fait les modèles de cycles biogéochimiques conceptuels et mathématiques considèrent généralement les communautés microbiennes comme des boîtes noires qui transforment les éléments à des taux régulés par des facteurs environnementaux calibrés de façon empirique. Cependant il s'est avéré que par ces méthodes, la prédiction des flux biogéochimiques *in situ* est difficile (Matson & Vitousek,

1990 ; Bouwman *et al.*, 1995 ; Brumme *et al.*, 1999). Cette difficulté peut être due en partie au fait qu'il existe des différences fonctionnelles entre les communautés microbiennes qui ne sont pas prises en compte dans ces modèles. Par exemple, la composition taxonomique des communautés microbiennes responsables de la production et de la consommation de N₂O varie beaucoup (Firestone & Davidson 1989). Si ces différentes communautés produisent ou consomment le N₂O à différents taux dans un même environnement, alors la prédiction des flux de N₂O sera difficile sans la prise en compte de ces variations (Cavigelli & Robertson, 2000).

A cette diversité de production induite par des communautés fonctionnelles différentes, se surimpose une variabilité due à l'hétérogénéité spatiale et temporelle des écosystèmes qui engendre un fonctionnement biogéochimique en hot spots (Parkin, 1987). Ces hot spots sont des zones qui présentent des activités disproportionnées par rapport à leur matrice environnante de façon constante ou épisodique. Il semble que cette structuration en hot spot soit perceptible quelle que soit l'échelle considérée, du micro-agrégat de sol au paysage (McClain *et al.*, 2003).

Notre projet est intitulé « Couplage des cycles du carbone et de l'azote en zones humides » (CAZHU). Les sites modèles de CAZHU sont localisés en Camargue, L'objectif général du projet est de (1) fournir des éléments qui permettront de mieux prévoir l'impact de deux « facteurs de forçage » (les changements d'utilisation des terres et de régimes hydrologiques) sur le fonctionnement biologique du sol et, en particulier, sur quatre fonctions microbiennes à l'origine d'émissions de gaz à effet de serre : respiration, nitrification, dénitrification et méthanogénèse et (2) comprendre les mécanismes de régulation de ces fonctions afin d'affiner ces outils de prévision *via* l'estimation du caractère plus ou moins réversible des impacts subis.

Quatre approches sont utilisées pour réaliser ce projet: (1) des mesures *in situ* visant à comparer les différentes situations entre elles quant à leur potentialité à exprimer les processus cités plus haut, (2) des mesures *in situ* des émissions elles-mêmes visant à évaluer la pertinence des mesures potentielles comme indicatrices des intensités d'émissions dans des objectifs de modélisation de la quantification des flux, (3) des expériences *in vitro* au cours desquelles l'évolution des processus potentiels est suivie en

fonction de modifications environnementales simulées et (4) un volet modélisation utilisant l'ensemble des données issues des approches précédentes et visant à mieux prédire les modifications.

Notre travail se situe uniquement dans le point (3), c'est-à-dire une approche simplifiée impliquant l'utilisation de microcosmes au laboratoire. Par ailleurs seuls deux des processus cités plus haut sont pris en compte, à savoir la respiration et la dénitrification responsables respectivement de deux des gaz à effet de serre principalement émis dans l'atmosphère: CO₂ et N₂O. Enfin, seul l'un des sites du projet CAZHU, à savoir un étang semi-permanent est considéré.

Ces deux fonctions microbiennes étudiées à l'origine d'émissions de CO₂ et de N₂O sont également considérées dans cette étude selon deux points de vue :

- 1) Tout d'abord pour l'impact environnemental important qu'elles peuvent avoir de par le flux qu'elles génèrent,
- 2) Ensuite, en tant que bio-descriptrices quantitatives et qualitatives de l'ampleur des modifications du fonctionnement du sédiment face à des perturbations. Nous considérons, en effet, que des indicateurs fonctionnels sont mieux adaptés que des indicateurs d'état pour traduire des modifications de fonctionnement.

Notre étude a eu pour objectif d'apporter des éléments de réponse aux questions suivantes :

1- les fonctions potentielles de respiration et de dénitrification d'un sédiment prélevé sous eau (hiver) sont-elles significativement affectées par un assèchement progressif ? Dans l'affirmative, avec quelle cinétique ? Et quelle capacité à recouvrer des valeurs initiales (résilience) lorsque l'épisode de sécheresse cesse ?

Par fonction potentielle, il faut comprendre que les mesures sont faites sur des échantillons de sédiment incubés au laboratoire sur de courtes durées (ne permettant pas de synthèse enzymatique *de novo* et, a

fortiori, pas de multiplication cellulaire des microorganismes du sédiment) mais dans des conditions non limitantes pour l'activité des enzymes responsables des fonctions étudiées :

- pour la respiration (Substrate Induced Respiration ou SIR - Beare *et al.*, 1990): apport en quantité non limitante de C organique en tant que donneur d'électrons et conditions les plus aérées possible.

- pour la dénitrification : apport en excès de C organique (en tant que donneur d'électrons) et de nitrate (en tant qu'accepteur d'électron) et maintien de conditions anoxiques (Tiedje, 1982 ; Lensi *et al.*, 1995).

Il s'agit donc en fait d'une mesure indirecte du pool enzymatique responsable des processus étudiés.

Dans le cas de notre travail, cette mesure potentielle est plus pertinente que la mesure des flux réels pour 2 raisons : (1) le caractère artificiel des incubations *in vitro* qui rend les mesures de flux difficilement interprétable et (2) le fait que des variations de potentiel traduisent, au moins en théorie, des modifications plus profondes et durables du fonctionnement du sédiment.

2- les éventuelles modifications des potentiels de fonctions (et, notamment, de respiration) en réponse à l'assèchement s'accompagnent-elles de modifications de la diversité fonctionnelle des microorganismes de ce sédiment ?

3- le fait que le sédiment provienne d'une zone soumise à des alternances saisonnières exondation/inondation ou d'une zone inondée en permanence est-il de nature à générer des réponses différentes aux questions 1 et 2 ?

Ces recherches ont été réalisées aux laboratoires du CEFÉ (centre d'écologie fonctionnelle et évolutive) – CNRS de Montpellier en France.

II- Matériels et méthodes

II.1- Présentation de la Camargue et du site d'étude

II.1.1- Situation géographique

La Camargue est une région du sud-est de la France qui est située dans le delta du Rhône, dans le département des Bouches-du-Rhône, dans la région Provence-Alpes-Côte d'Azur. Elle se situe à une latitude de 43,34 N et une longitude de 4,34 E. Cette région se caractérise par un climat méditerranéen. La Camargue est une grande étendue de terres plates et marécageuses, d'une superficie d'environ 100 000 ha. La plus grande partie de la Camargue est sauvage, trop marécageuse et saline pour être cultivée. De grands domaines d'élevage de bovins (dont les taureaux noirs pour la tauromachie) et de chevaux laissent la place dans le nord, là où les terres sont moins salées, à la culture du riz sous irrigation (Encyclopédie Ecarta 2006) qui occupent 18 % de surfaces (museum.agropolis.fr). La Camargue fait parties des zones humides qui constituent des écosystèmes très vulnérables parce qu'ils sont très bas par rapport au niveau de la mer (Brinson & Alvarez, 2002)

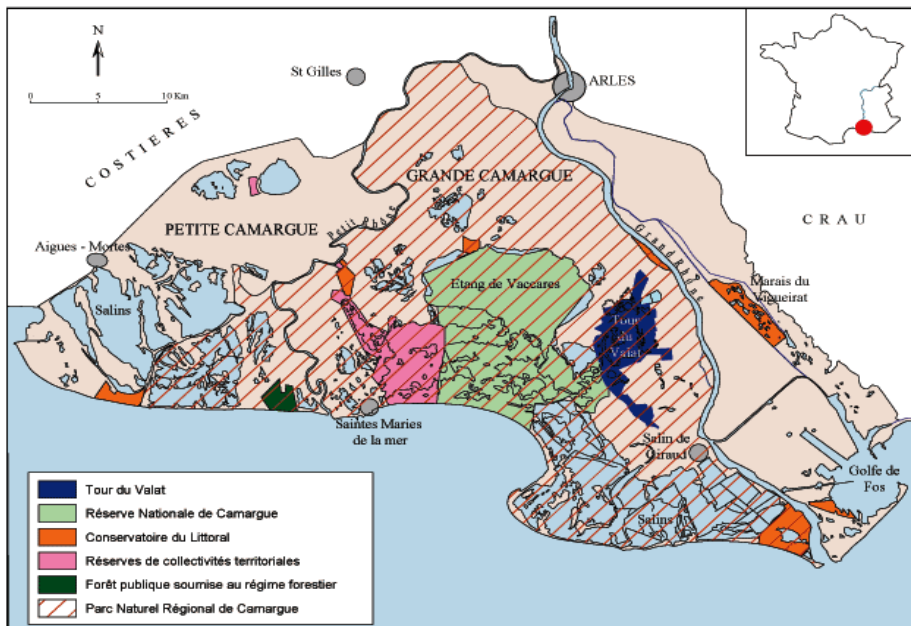


Fig. 1. Carte des Zones humides de la Camargue

II.1.2- Site d'étude

Les prélèvements ont été réalisés sur l'étang de la Baisse Salée qui se trouve dans la réserve naturelle volontaire de la Tour du Valat, en Camargue, qui couvre une surface de 2500 ha. Un lot de sédiment a été prélevé au nord de l'étang sous environ 40 cm d'eau, dans une zone qui connaît des alternances inondation (hiver) / exondation (été). Ce sédiment est désigné sous le nom de « sédiment A ». Le deuxième est prélevé plus au sud, dans une zone qui se trouve au centre de l'étang, sous environ 80 cm d'eau. Cette zone de l'étang ne subit pas d'alternance, elle est sous eau toute l'année. Ce sédiment est nommé « sédiment B ». Sur chaque site A et B, 5 lots de sédiments frais ont été prélevés sur 10 cm de profondeur sur une surface d'environ 30 m² pour ainsi former un échantillon composite.



Fig. 2. Baisse salée en été, 11 Août 2005



Fig. 3. Baisse salée en hiver, Avril 2005

II.1.3- Caractéristiques du sédiment

Tableau 1. Caractéristiques du sédiment A et du sédiment B

Le tableau 1 représente les caractéristiques des sédiments A et B. Le pH est mesuré sur un mélange sédiment – eau 1 : 2,5. La teneur en nitrate est mesurée par colorimétrie (voir II.3.3- Détermination de la teneur en nitrate).

Caractéristiques	Sédiment A	Sédiment B
Texture (n = 5)	< 50 µm : 89,9 % 200-50 µm : 7,2 % 500-200 µm:1,9 % > 500 µm : 0,9 %	< 50 µm : 81,4 % 200-50 µm : 12,1% 500-200 µm : 4,5 % > 500 µm : 2,0 %
Humidité (n = 9)	0,84 g d'H ₂ O g ⁻¹ de sédiment sec	1,20 g d'H ₂ O g ⁻¹ de sédiment sec
Quantité de débris organique (n = 3)	0,0027 g de débris organique g ⁻¹ de sédiment sec	0,0158 g de débris organique g ⁻¹ de sédiment sec
pH (n = 3)	7,52	7,62
Teneur en NH₄⁺ (n = 9)	0,0326 mg de NH ₄ ⁺ g ⁻¹ de sédiment sec	0,0604 mg de NH ₄ ⁺ g ⁻¹ de sédiment sec
Teneur en NO₃⁻ (n = 9)	0,0033 mg de NO ₃ ⁻ g ⁻¹ de sédiment sec	0,0026 mg de NO ₃ ⁻ g ⁻¹ de sédiment sec
Teneur en Carbone (n = 9)	7,74 %	8,81 %
Teneur en Azote (n = 9)	0,47 %	0,53 %

n : nombre d'échantillon

II.2- Conditions d'incubation des échantillons

Les sédiments prélevés dans l'étang de la Baisse Salée sont conservés sous abri pendant une nuit. Le lendemain ils sont soigneusement homogénéisés avec un mélangeur de sédiment.

Les 2 lots de sédiment (A et B) sont répartis dans des microcosmes en plastique circulaire d'un diamètre de 10 cm et d'une hauteur de 5 cm (350 g de sédiment frais par microcosme). Ces microcosmes sont munis dans leurs parties inférieures d'une toile d'une maille de 1 mm. Chaque microcosme est placé dans une coupelle en plastique au fond de laquelle est placé un disque de feutrine qui est destiné à optimiser le maintien de l'humidité du sédiment. 100 ml d'eau distillée sont ajoutés à l'ensemble des microcosmes. Puis les microcosmes sont incubés dans une chambre obscure et à une température de 25° C.

Pendant les 4 premiers jours, tous les échantillons sont soumis au même traitement : apport régulier d'eau permettant le maintien d'une pellicule d'environ 1 à 2 cm au dessus de la surface du sédiment, donc une saturation permanente. A partir du cinquième jour trois traitements sont appliqués sur le sédiment :

- 1) 30 microcosmes du sédiment A et 30 microcosmes du sédiment B sont maintenus sous eau pendant toute l'expérience : traitements Ah et Bh
- 2) 30 microcosmes du sédiment A et 30 microcosmes du sédiment B ne sont pas réhumectés (assèchement progressif) pendant 1 mois puis réhumectés 1 fois à t = 31 jours : traitements Aa et Ba.
- 3) 30 microcosmes du sédiment A et 30 microcosmes du sédiment B ne sont jamais réhumectés jusqu'à la fin de l'expérience : traitements As et Bs.

La couche d'eau distillée qui est ajoutée au sédiment pour le traitement « h » ou pour la réhumectation du traitement « a » à t = 31 jours est d'environ 30 ml de manière à maintenir le sédiment dans un état de saturation.

Aux temps T = 0, 4, 11, 19, 25, 32, 39, 46 jours et 53 jours, trois microcosmes de chaque traitement (3 réplicats pour chaque traitement) et de chaque sédiment (A et B) sont pris au hasard et amenés au laboratoire pour les analyses. Avant de procéder aux analyses le contenu de chaque microcosme a été soigneusement homogénéisé.

II.3- Analyses réalisées

II.3.1 - Détermination de la teneur en eau du sédiment

Pour chaque microcosme, à chaque temps de prélèvement, 10 g de sédiment frais sont pesés dans une coupelle en aluminium, séchés à 105° C à l'étuve, puis pesés de nouveau pour déduire le taux d'humidité .

II.3.2 - Analyses des teneurs en C et N total (CHN) et de la qualité biochimique de la M.O. (NIRS)

La méthode CHN

L'analyse élémentaire (CHN) permet de doser les teneurs en Carbone, Hydrogène et Azote. Cette analyse a été effectuée sur 2 séries d'échantillons de sédiment : la série qui correspond au T = 0 jours (début de l'expérience) et celle qui correspond au T = 53 jours (fin de l'expérience).

Trois atropines standard sont introduites dans des nacelles en étain tarées et mises dans une microplaque contenant 96 puits. 15 à 20 mg de sédiment broyé sont placés dans une nacelle en étain tarée qui est mise dans la microplaque. Une atropine inconnue est introduite tous les dix échantillons. La capsule en étain est placée dans un four à 1100°C en présence d'oxygène et d'oxyde de cuivre. La température atteint 1800°C pendant la combustion flash de la capsule. Après la combustion, les produits gazeux sont identifiés grâce à des détecteurs appropriés.

La détermination de la teneur en Carbone, en Azote et en Hydrogène se fait à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (EA 1112 NC.Soil Thermo Electron, Downers grove., Illinois, USA). Seules les données relatives au Carbone et à l'Azote ont été utilisées dans cette étude.

La méthode NIRS

La méthode NIRS (Near Infra-red Reflectance Spectroscopy) permet d'analyser les éléments par réflectance dans le proche infrarouge.

Les échantillons de sédiments broyés, sont placés et tassés délicatement dans des cellules en quartz afin d'obtenir une surface plane. Chaque constituant des complexes organiques du sol contenant du carbone et de l'azote présente une absorption spécifique dans le spectre du proche infra rouge entre 700 et 2500 nm. Cette absorption est due aux vibrations d'élongation et cisaillement des liaisons inter-élément (Velasquez *et al.*, 2005). Un spectromètre NIRS (NIRS 6500 autocup, foss Tecator., Hoganas, Seweden) est utilisé pour réaliser cette analyse. Le traitement du signal est fait à l'aide d'un logiciel informatique qui a fourni des résultats à partir des spectres obtenus (Ludwing *et al.*, 2002).

II.3.3 – Détermination de la teneur en nitrate

Préparation des échantillons

Les échantillons de sédiments sont conservés au froid à -18°C pendant 3 mois. Ce sont les échantillons de la première ($T = 0$ jours) et de la dernière série ($T = 53$ jours) qui sont utilisés pour effectuer cette analyse.

5 g de sédiment de chaque microcosme sont placés dans de petits flacons en plastique auquel sont ajoutés 20 ml d'une solution de Chlorure de Potassium (KCl) 1 M et d'acide sulfurique (H_2SO_4) 0,1 N.

Les flacons sont soigneusement refermés et placés dans un agitateur mécanique pendant 20 minutes.

Le mélange est ensuite filtré. Les filtrats sont récupérés dans des tubes en plastique. Ces tubes sont refermés à la fin de la filtration. Les filtrats de sédiment sont conservés au congélateur à une température de -20°C .

Mesure du taux de Nitrate

Dans une première étape, les nitrates présents dans les filtrats de sédiment sont réduits en nitrite par une colonne réductrice au Cadmium-Cuivre qui fait partie d'un colorimètre en flux continu (Chaine Evolution II, Alliance Instrument., Frépillon, France). Puis, ils sont mis en contact avec un réactif coloré préparé comme suit : 20 g de Sulfanilamide ($C_6H_8N_2O_2S$) est ajouté à une solution de 1,5 litre d'eau distillée et 200 ml d'acide phosphorique concentré (H_3PO_4), ce mélange est dissout avec un agitateur chauffant. 1 g de N-1 Naphtyl éthylène-diamine dihydrochlorure ($C_{12}H_{14}N_2, 2HCl$) est ajouté et dissout. 2 litres d'eau distillée sont ajoutées. A la fin 1 ml d'un agent mouillant le polyéthylène glycol dodecyl éther réduit (BRIJ 35) est ajouté.

Les Nitrites réagissent avec $C_6H_8N_2O_2S$ pour donner un composé diazo qui forme avec $C_{12}H_{14}N_2, 2HCl$ un complexe coloré en rose violacé qui est mesuré par absorbance à 520 nm.

La solution étalon est préparée en diluant au $1/10^{ème}$ une solution mère à $1mg\ ml^{-1}$. Une gamme étalon est préparée à chaque dosage, à partir de KNO_3 .

II.3.4- Analyses des fonctions microbiennes

II.3.4.1- Dénitrification potentielle

Pour chaque microcosme, 20 g de sédiment frais sont placés dans un flacon à plasma de 150 ml, qui est fermé avec un septum et une bague en aluminium. L'atmosphère interne des flacons à plasma est remplacée par de l'hélium ce qui permet de placer les échantillons de sédiment en conditions d'anaérobiose. L'atmosphère des flacons est remise à pression atmosphérique en fin de programme. 15 ml de l'atmosphère des flacons sont prélevés à la seringue et remplacés par 15 ml d'acétylène. L'acétylène inhibe l'activité de la N_2O réductase (oxyde nitreux réductase) responsable de la dernière étape de dénitrification (Luo *et al.*, 1996).

10, 15 ou 20 ml (selon le niveau d'assèchement des échantillons) de solution contenant du glucose, de l'acide glutamique et du nitrate de potassium sont ajoutés au sédiment. Plusieurs solutions sont donc préparées de façon à apporter systématiquement dans tous les flacons les mêmes quantités de C des 2 composés carbonés (1 mg C-glucose / g sédiment, 1 mg C-acide glutamique / g sédiment et 0,2 mg N - NO₃⁻ par gramme de sédiment). Donneurs et accepteurs d'électrons sont donc apportés en excès afin que le fonctionnement enzymatique des microorganismes du sol ne soit pas limité par le substrat (cinétique d'ordre 0).

Les flacons sont agités quelques secondes pour homogénéiser leurs contenus. Ils sont incubés à une température de 25° C. La mesure de la concentration en N₂O dans l'atmosphère du flacon est faite après 2 h et 6 h d'incubation à 25°C à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse à détection par capture d'électron (CP-3800, Varian Inc., Palo Alto, USA).

En fin d'expérience les flacons sont ouverts et séchés à l'étuve à 105 ° C (ou 60 °C), puis pesés pour déduire le poids sec.

La dénitrification potentielle est exprimée en µg N-N₂O /g de sédiment sec/h qui est obtenu de la manière suivante :

$$\mu\text{g N} = \frac{\text{vpm } (\mu\text{l l}^{-1}) \cdot 14 \text{ g/mole} \cdot \text{Volume du flacon (l)}}{22,4 \text{ l mole}^{-1} \cdot \text{Poids sec du sédiment (g)} \cdot \text{temps (h)}}$$

II.3.4.2- Respiration potentielle (Substrate induced respiration : SIR)

20 g de sédiment frais sont placés dans un flacon à plasma de 150 ml. Dans chaque flacon sont mis 5 ml, 12,5 ml ou 15 ml, de façon à atteindre une teneur en eau équivalente à la capacité au champ pour tous les échantillons, quel que soit le niveau d'assèchement initial des échantillons. Comme pour la dénitrification, plusieurs solutions sont donc préparées de façon à apporter systématiquement dans tous les flacons la même quantité de C-glucose (Beare *et al*, 1991) par

gramme de sédiment, soit 1 mg. Comme pour la dénitrification cette quantité est considérée comme non limitante.

Les échantillons sont incubés à une température de 25° C. La mesure de la concentration en CO₂ dans l'atmosphère des flacons se fait après 2 h et 6 h d'incubation à 25°C à l'aide d'un microcatharomètre (CP-4900, Varian Inc., Palo Alto, USA). Les flacons sont ouverts et séchés à l'étuve à 105 ° C (ou 60 °C), puis pesés pour déduire le poids sec exact. La respiration potentielle est mesurée en µg C-CO₂/g de sédiment sec/h qui est obtenu de la manière suivante :

$$\mu\text{g C} = \frac{\text{vpm } (\mu\text{l l}^{-1}) \cdot 12 \text{ g/mole} \cdot \text{Volume du flacon (l)}}{22,4 \text{ l mole}^{-1} \cdot \text{Poids sec du sédiment (g)} \cdot \text{temps (h)}}$$

II.3.5- Analyses de la diversité microbienne

La diversité métabolique des communautés microbiennes est caractérisée par la méthode des Ecoplates Biolog. Ces analyses sont effectuées sur les échantillons de sédiment qui correspondent au T = 0 jours (début de l'expérience) et au T = 53 jours (fin de l'expérience).

Dans cette méthode des microplaques en plastique sont utilisées, elles contiennent 32 puits, 31 puits contenant des sources de carbone qui sont essentiellement des acides aminés, des amines, des acides organiques et des sucres et un puits à blanc (Bergner *et al*, 2004).

Dans 100 ml d'eau stérile, 15 grammes de sédiment (poids sec) sont agités avec un barreau aimanté pendant 5 minutes à vitesse maximale. Puis la solution va décanter pendant 15 minutes (dilution d₀).

Les surnageants sont dilués dans les flacons d'une solution tampon de Phosphate et de Sodium (SPB) à 0,1 M et les solution suivantes ont été préparées : 1 ml de d₀ + 9 ml solution (d₁₀), 2 ml de d₁₀ + 18 ml solution (d₁₀₀), 1 ml de d₁₀₀ + 9 ml solution (d₁₀₀₀). Les 20 ml de la dilution d₁₀₀₀ sont versés dans une cuvette et inoculés à l'aide d'une pipette multicanaux dans une microplaque Ecoplates Biolog, 150 µl sont mis dans chaque puits.

La densité optique est mesurée à 590 nm (0,1 s par puits, sans le couvercle) tous les jours à heure fixe (vers 18 heures) avec le lecteur de microplaque (Victor 3, Perkin Elmer., Nellesley, USA). L'utilisation des substrats par les bactéries qui sont présentes dans l'inoculum se traduit par un virement de l'indicateur coloré à une couleur violette. La lecture est effectuée dans l'ordre où les plaques sont inoculées. Après inoculation des microplaques 100 µl de dilution d₁₀₀₀ sont étalées (avec un râteau en verre flambé à l'alcool) sur milieu TSA/10 à raison de 3 boîtes par échantillon. Les boîtes sont incubées à 25°C pendant 4 jours puis les colonies sont dénombrées.

II.4- Tests statistiques

Les comparaisons statistiques sont faites à l'aide du test de Student sur le logiciel excel.

III- Résultats

Pour faciliter la lecture des résultats nous rappelons brièvement la signification des appellations qui sont données aux microcosmes.

Les microcosmes sont nommés selon la zone où est prélevé le sédiment. Le sédiment qui est prélevé en bordure au nord de l'étang, d'une zone de l'étang de la Baisse Salée qui est en alternance entre périodes sèches et périodes humides correspond au sédiment « A ». Le sédiment qui est prélevé plus au sud, d'une zone qui se trouve au centre de l'étang, et qui ne subit pas d'alternance, puisqu'il est sous eau toute l'année, correspond au sédiment « B ».

Les microcosmes sont également nommés selon le traitement qu'ils ont subi, de la manière suivantes :

« h » qui correspond au traitement humide pour les microcosmes qui sont en permanence sous eau, pendant toute l'expérience ;

« a » qui correspond au traitement alterné pour les microcosmes qui sont maintenus secs pendant 1 mois puis réhumectés à T = 31 jours, puis à nouveau laisser sécher ;

« s » qui correspond au traitement sec pour les microcosmes qui sont laissés sécher pendant toute l'expérience.

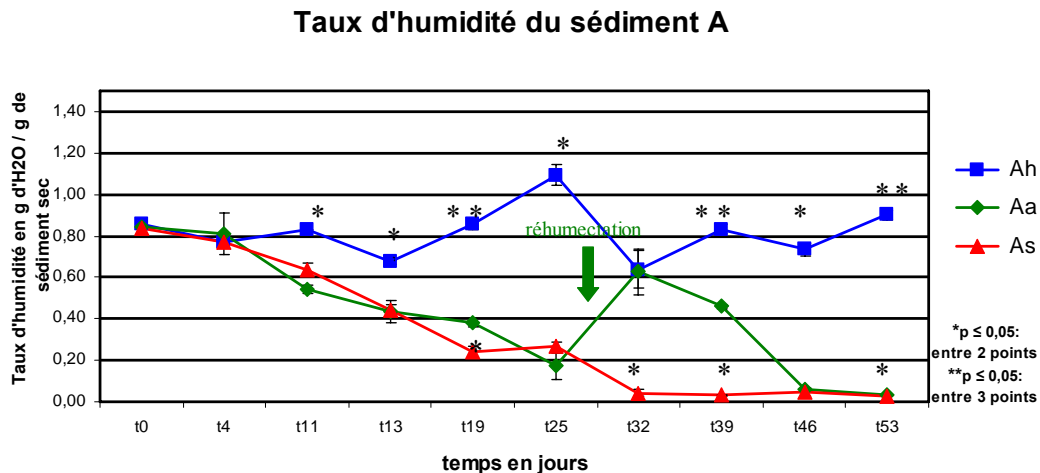
Les résultats sont donc observés sur les microcosmes ayant l'appellation suivante : Ah, Aa, As, Bh, Ba, Bs.

II.1- Evolution des variables physico-chimiques du sédiment

III.1.1- Taux d'humidité

La figure 4 a montré qu'au moment du prélèvement le taux d'humidité du sédiment B est supérieur à celui du sédiment A. Dans les microcosmes qui sont maintenus en permanence sous eau (Ah, Bh) le taux d'humidité a montré des fluctuations mais s'est maintenu approximativement à la valeur initiale. Dans les microcosmes As et Bs (aucun apport d'eau jusqu'à la fin de l'expérience) le taux d'humidité a diminué progressivement pour arriver à une valeur nulle à T = 32 jours pour As (Fig. 4 a) et à T = 25 jours pour Bs (Fig. 4 b). L'évolution de la teneur en eau dans les microcosmes Aa et Ba est très similaire à celle des microcosmes As et Bs jusqu'à l'apport d'eau au T = 31 jours qui entraîne une remontée des valeurs du taux d'humidité dans les microcosmes Aa et Ba. Toutefois ces microcosmes n'ont pas atteint les taux d'humidité des microcosmes Ah et Bh. L'évolution du taux d'humidité en fonction des 3 traitements hydriques a montré que le taux d'humidité dans les microcosmes Aa, As et Ba, Bs a commencé à diminuer significativement ($p \leq 0,05$) à partir du T = 11 jours. Cette diminution est plus accentuée pour les microcosmes Aa et As, car le sédiment A a répondu plus fortement au séchage (Fig. 4 a).

a.



b.

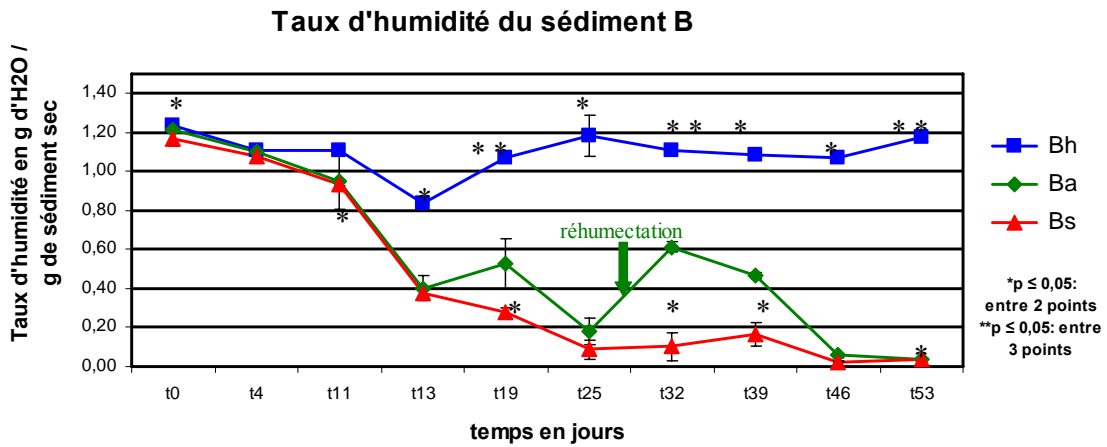


Fig. 4. Taux d'humidité dans le sédiment

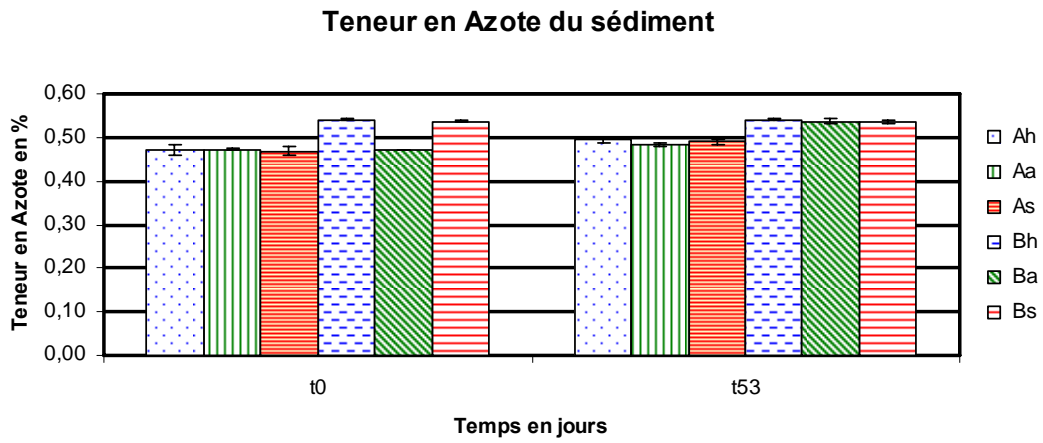
III.1.2- Teneurs en Carbone et en Azote

Teneurs en Carbone et en Azote par la méthode CHN

Quel que soit le traitement auquel sont soumis les microcosmes, le sédiment B est systématiquement plus riche en C et en N total que le sédiment A (Fig. 5). Néanmoins il est important de noter que les différences des teneurs en C et en N total des 2 sédiments ne sont pas significatives ($p \geq 0,05$).

En revanche aucune modification de la teneur en C et en N n'est observée entre le début et la fin de l'incubation ni dans la sédiment A ni dans le sédiment B.

a.



b.

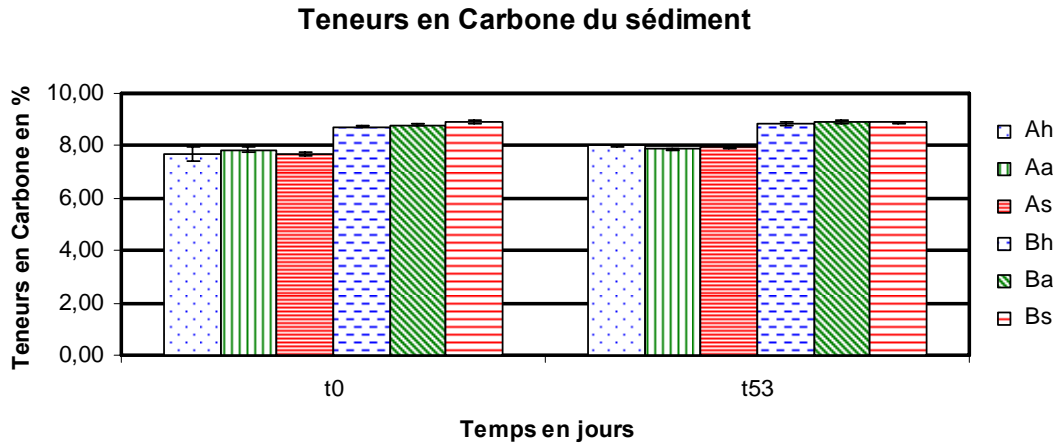


Fig. 5. Teneur en Carbone et en Azote total dans le sédiment par la méthode CHN

Caractéristique de la matière organique (méthode NIRS)

L'analyse en composante principale (ACP) qui est présentée dans la figure 6 a montré que les spectres NIRS se séparent selon l'axe 2 en fonction de la localisation du prélèvement (A ou B).

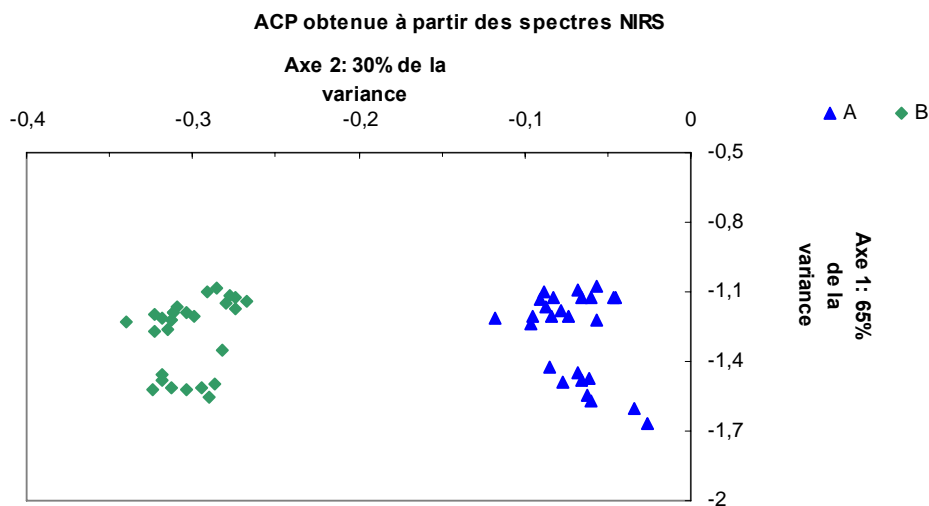


Fig. 6. ACP obtenue à partir des spectres de la NIRS

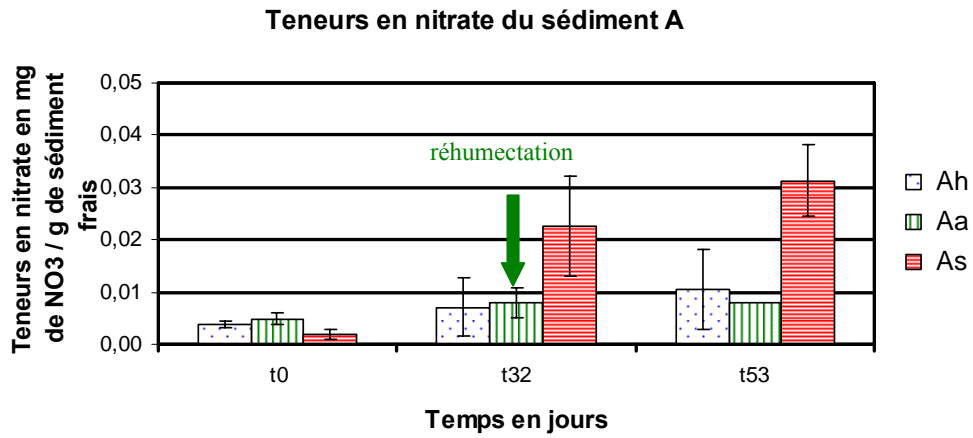
III.1.3- Teneurs en nitrate dans le sédiment

La figure 7 montre l'évolution des teneurs en nitrate dans le sédiment A et le sédiment B en fonctions des traitements h, a ou s.

Au début de l'incubation ($T = 0$ jours) les différents sédiments ont présenté logiquement des valeurs similaires dans le sédiment A d'une part et dans le sédiment B d'autre part. Les tendances de l'évolution du nitrate sont ensuite différentes dans le sédiment A et dans le sédiment B. Le point le plus marquant de cette différence a été qu'une accumulation progressive du nitrate qui est observée dans les microcosmes du sédiment A qui sont soumis à un assèchement progressive du début jusqu'à la fin de l'expérience (Fig. 7 a), alors que cette évolution n'existe pas dans le sédiment B (Fig. 7 b). En revanche dans le sédiment B une accumulation du nitrate est observée à $T = 53$ jours pour le microcosme Ba.

Les différences qui sont observées dans la figure 7 ne sont pas significatives. Néanmoins, la teneur en nitrate dans le microcosme Ba a augmenté significativement ($p \leq 0,05$) après réhumectation au T = 31 jours (Fig. 7 b).

a.



b.

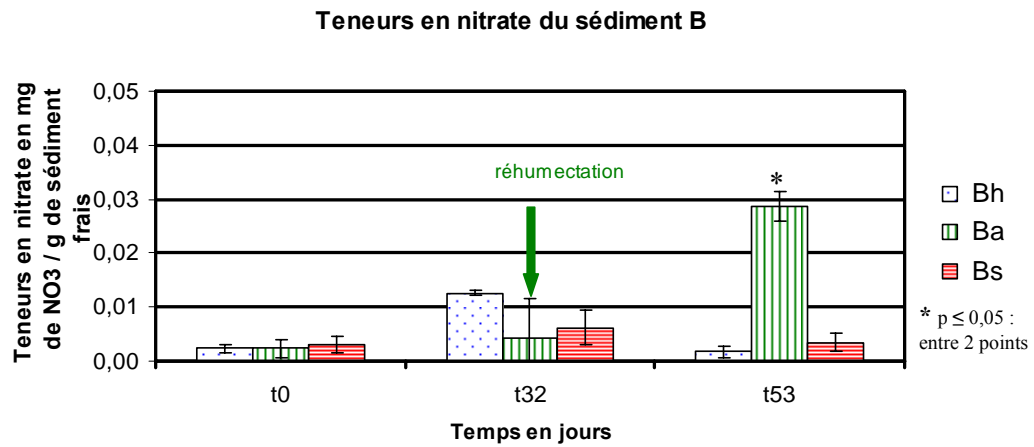


Fig. 7. Teneurs en nitrate dans le sédiment

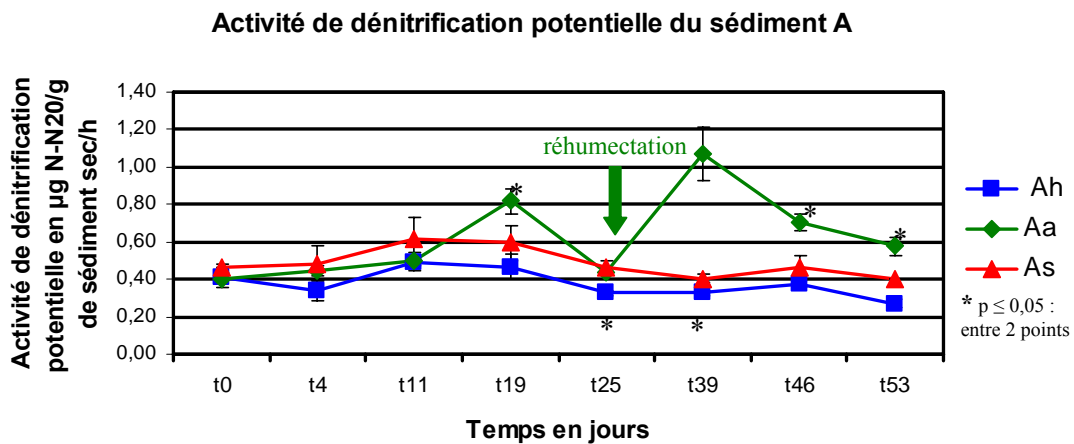
III.2- Evolution des variables biologiques du sédiment

III.2.1- Evolution de la dénitrification potentielle

L'activité de dénitrification potentielle initiale est similaire dans les microcosmes Ah, Aa, As, Bh, Ba et Bs. La figure 8 a montré que l'activité de dénitrification potentielle a varié au cours de l'expérience.

L'activité de dénitrification potentielle des microcosmes Ah, As et Bh a sensiblement varié au cours de l'expérience. La réhumectation des microcosmes Aa et Ba au T = 31 jours a entraînée une augmentation de l'activité de dénitrification potentielle qui est plus importante dans les microcosmes Aa. Cette activité de dénitrification potentielle a diminué après que les microcosmes Aa et Ba soient de nouveau dans des conditions d'assèchement.

a.



b.

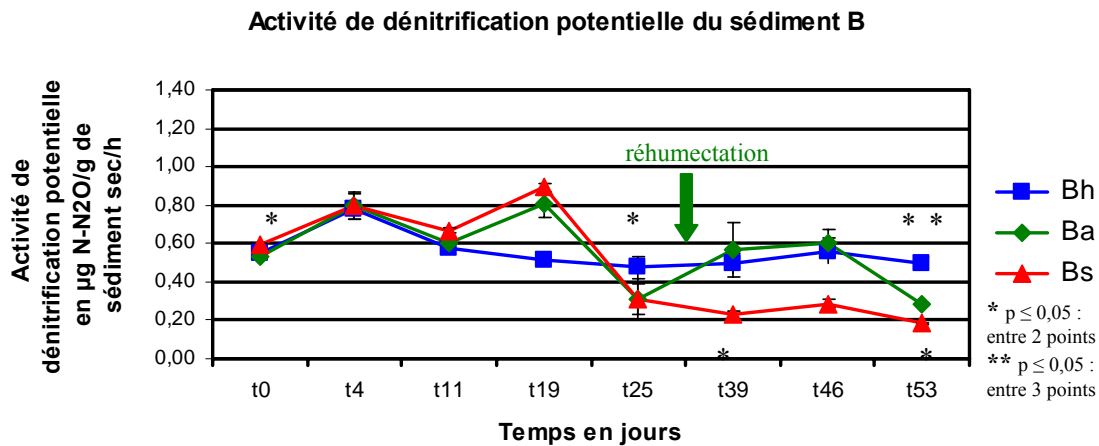


Fig. 8. Evolution de l'activité de dénitrification potentielle du sédiment

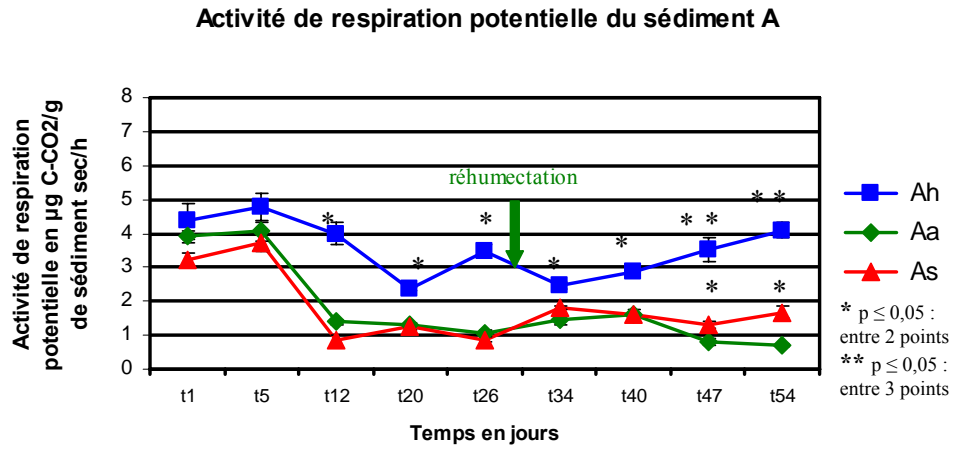
III.2.2- Evolution de la respiration potentielle

Les analyses de respiration potentielle ont montré que l'assèchement du sédiment affecte régulièrement cette fonction.

Les microcosmes Ah et Bh ont une activité de respiration potentielle élevée tout au long de l'expérience. L'activité de respiration potentielle diminue très fortement dans les microcosmes Aa et As. La réhumectation des microcosmes Aa et Ba au T = 31 jours entraîne une augmentation de l'activité de respiration potentielle. Cet effet de la réhumectation est plus visible dans les microcosmes Ba qui ont une activité de respiration potentielle plus forte au T = 31 jours. Cette activité diminue quand les microcosmes Aa et Ba sont de nouveau laissés sécher, la diminution est brutale dans le microcosme Ba.

L'activité de respiration potentielle a commencé à diminuer significativement au T = 13 jours dans les microcosmes Aa, As, Ba et Bs (Fig. 9).

a.



b.

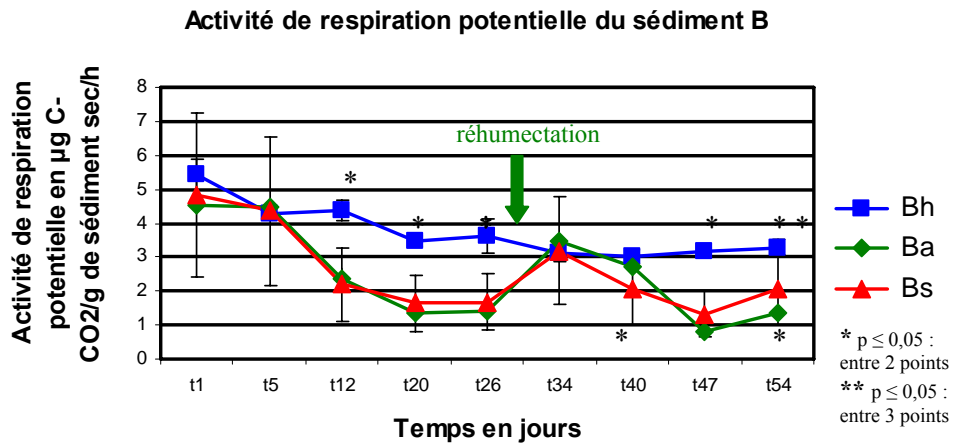


Fig. 9. Evolution de l'activité de respiration potentielle du sédiment

III.2.3- La diversité microbienne

La diversité microbienne des 2 sédiments a été comparée en début d'expérience (T = 0 jours) et en fin d'expérience (T = 53 jours). Cette comparaison a permis de constater que la communauté

microbienne des 2 sédiments A et B a consommé au T = 0 jours a peu près le même nombre de substrats bien que ce ne soit pas toujours les mêmes (Tableau 2, Fig. 10. a.)

Au T = 53 jours le nombre de substrats utilisés a fortement diminué dans les microcosmes As et Bs qui ont subi un assèchement. Par contre la communauté microbienne des microcosmes Ba et Bh a conservé une très forte diversité métabolique (Tableau 2, Fig. 10. b.)

Tableau 2. Niveau d'utilisation des substrats Biolog Ecoplates : Le niveau de consommation du substrat est basé sur la moyenne des DO_{590nm} obtenues après 96h pour les 3 réplicats. Un substrat est considéré comme étant consommé si cette moyenne est supérieure à 0.10. Pour chaque traitement (sédiments A ou B, traitement humide h, alterné a ou sec s) est indiqué la densité d'UFC par gramme de sol sec (dénombrements sur TSA/10 après 96 h à 25°C).

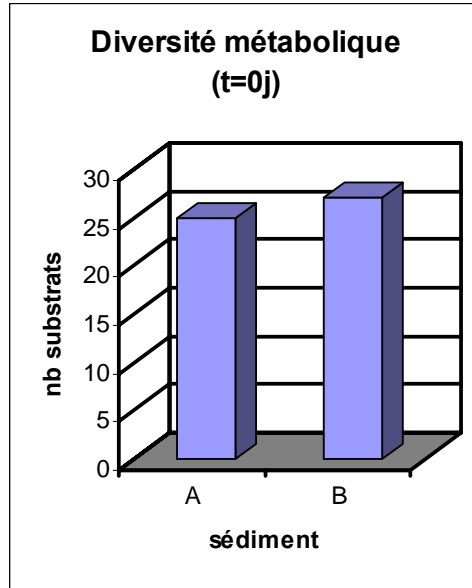
a. Début de l'expérience (T = 0 jours, 2 février 2006)

Substrat	A (4.7 10 ⁶ ufc g ⁻¹)	B (4.4 10 ⁶ ufc g ⁻¹)
β-methyl-D-glucoside	0.65 (±0.66)	1.66 (±0.08)
D-galactonic acid γ-lactone	0.06 (±0.06)	0.11 (±0.08)
L-arginine	0.90 (±0.33)	0.51 (±0.44)
pyruvic acid methyl ester	1.13 (±0.12)	1.11 (±0.21)
D-xylose	0.57 (±0.82)	0.55 (±0.44)
D-galacturonic acid	1.17 (±0.55)	1.57 (±0.09)
L-asparagine	1.60 (±0.70)	1.37 (±0.26)
tween 41	1.30 (±0.42)	1.31 (±0.26)
i-erythritol	0.21 (±0.17)	0.08 (±0.03)
2-hydroxy-benzoic acid	0.00 (±0.00)	0.00 (±0.01)
L-phenylalanine	0.13 (±0.10)	0.14 (±0.06)
tween 81	1.35 (±0.58)	0.88 (±0.53)
D-mannitol	1.20 (±0.87)	2.09 (±0.10)
4-hydroxy benzoic acid	0.24 (±0.30)	0.64 (±0.40)
L-serine	0.92 (±0.82)	0.58 (±0.62)
α-cyclodextrin	0.91 (±0.46)	0.41 (±0.35)
N-acetyl-D-glucosamine	1.33 (±0.90)	1.82 (±0.23)
γ-hydroxybutyric acid	0.16 (±0.07)	0.25 (±0.16)
L-threonine	0.05 (±0.04)	0.23 (±0.27)
Glycogen	0.87 (±0.91)	0.55 (±0.40)
D-glucosaminic acid	0.18 (±0.24)	0.74 (±0.72)
itaconic acid	0.23 (±0.37)	0.03 (±0.01)
glycyl-L-glutamic acid	0.57 (±0.25)	0.30 (±0.40)
D-cellobiose	1.22 (±0.67)	1.71 (±0.27)
glucose-1-phosphate	0.51 (±0.49)	0.67 (±0.14)
α-ketobutyric acid	0.02 (±0.00)	0.01 (±0.01)
Phenylethylamine	0.00 (±0.00)	0.27 (±0.46)
α-D-lactose	0.87 (±0.47)	0.51 (±0.63)
D,L-α-glycerol phosphate	0.06 (±0.05)	0.19 (±0.03)
D-malic acid	0.40 (±0.48)	0.52 (±0.14)
Putrescine	0.86 (±0.47)	0.36 (±0.12)
Nb substrats	25	27

b. Fin de l'expérience (T = 53 jours, 27 mars 2006)

Substrat	Aa (2.2 10 ⁵ ufc g-1)	Ah (8.0 10 ufc ⁵ g-1)	As (3.8 10 ufc ⁵ g-1)	Ba (5.1 10 ⁵ ufc g-1)	Bh (1.3 10 ⁶ ufc g-1)	Bs (5.5 10 ufc ⁵ g-1)
β-methyl-D-glucoside	0.01 (±0.01)	0.02 (±0.02)	0.01 (±0.00)	0.01 (±0.01)	1.16 (±0.75)	0.01 (±0.02)
D-galactonic acid γ-lactone	0.01 (±0.01)	0.01 (±0.00)	0.01 (±0.01)	0.25 (±0.40)	0.02 (±0.01)	0.01 (±0.01)
L-arginine	0.01 (±0.00)	0.03 (±0.03)	0.19 (±0.32)	0.61 (±0.68)	0.42 (±0.66)	0.00 (±0.01)
pyruvic acid methyl ester	0.02 (±0.02)	0.68 (±0.28)	0.10 (±0.08)	1.00 (±0.23)	1.28 (±0.40)	0.01 (±0.01)
D-xylose	0.03 (±0.02)	0.18 (±0.12)	0.03 (±0.00)	0.01 (±0.01)	0.81 (±1.19)	0.02 (±0.01)
D-galacturonic acid	0.04 (±0.01)	0.04 (±0.01)	0.01 (±0.01)	0.92 (±0.26)	1.13 (±0.98)	0.01 (±0.01)
L-asparagine	0.01 (±0.01)	0.69 (±0.37)	0.18 (±0.27)	0.50 (±0.27)	1.55 (±0.55)	0.01 (±0.01)
tween 41	0.29 (±0.18)	0.61 (±0.29)	0.11 (±0.06)	0.51 (±0.21)	0.87 (±0.54)	0.05 (±0.01)
i-erythritol	0.02 (±0.02)	0.02 (±0.02)	0.09 (±0.06)	0.02 (±0.00)	0.04 (±0.05)	0.02 (±0.01)
2-hydroxy-benzoic acid	0.01 (±0.01)	0.02 (±0.02)	0.01 (±0.01)	0.00 (±0.01)	0.02 (±0.02)	0.02 (±0.01)
L-phenylalanine	0.01 (±0.01)	0.09 (±0.12)	0.01 (±0.00)	0.03 (±0.02)	0.08 (±0.08)	0.01 (±0.00)
tween 81	0.21 (±0.17)	0.65 (±0.37)	0.03 (±0.00)	0.86 (±0.53)	0.94 (±0.30)	0.03 (±0.01)
D-mannitol	0.02 (±0.01)	0.27 (±0.32)	0.03 (±0.01)	0.17 (±0.03)	1.66 (±0.66)	0.06 (±0.08)
4-hydroxy benzoic acid	0.02 (±0.02)	0.22 (±0.19)	0.02 (±0.01)	0.32 (±0.52)	0.45 (±0.72)	0.04 (±0.01)
L-serine	0.02 (±0.02)	0.24 (±0.41)	0.01 (±0.01)	0.66 (±0.14)	0.65 (±0.48)	0.02 (±0.00)
α-cyclodextrin	0.00 (±0.00)	0.01 (±0.01)	0.03 (±0.03)	0.02 (±0.01)	0.02 (±0.02)	0.01 (±0.00)
N-acetyl-D-glucosamine	0.01 (±0.01)	0.06 (±0.01)	0.08 (±0.06)	0.15 (±0.12)	1.41 (±0.40)	0.06 (±0.07)
γ-hydroxybutyric acid	0.05 (±0.01)	0.26 (±0.26)	0.16 (±0.20)	0.09 (±0.02)	0.13 (±0.17)	0.11 (±0.03)
L-threonine	0.00 (±0.00)	0.02 (±0.02)	0.02 (±0.01)	0.02 (±0.02)	0.09 (±0.15)	0.02 (±0.01)
Glycogen	0.11 (±0.10)	0.05 (±0.02)	0.02 (±0.00)	0.20 (±0.15)	0.63 (±0.52)	0.03 (±0.01)
D-glucosaminic acid	0.01 (±0.01)	0.01 (±0.01)	0.02 (±0.01)	0.01 (±0.01)	0.03 (±0.04)	0.03 (±0.01)
itaconic acid	0.01 (±0.01)	0.01 (±0.00)	0.02 (±0.02)	0.33 (±0.28)	0.06 (±0.09)	0.03 (±0.01)
glycyl-L-glutamic acid	0.01 (±0.01)	0.01 (±0.02)	0.01 (±0.01)	0.10 (±0.08)	0.04 (±0.04)	0.02 (±0.00)
D-cellobiose	0.01 (±0.01)	0.09 (±0.03)	0.08 (±0.12)	0.05 (±0.06)	0.75 (±0.59)	0.02 (±0.01)
glucose-1-phosphate	0.02 (±0.02)	0.01 (±0.01)	0.01 (±0.01)	0.16 (±0.22)	0.51 (±0.13)	0.02 (±0.01)
α-ketobutyric acid	0.01 (±0.02)	0.01 (±0.00)	0.01 (±0.01)	0.01 (±0.01)	0.02 (±0.02)	0.03 (±0.01)
Phenylethylamine	0.01 (±0.01)	0.00 (±0.00)	0.01 (±0.01)	0.25 (±0.42)	0.45 (±0.76)	0.03 (±0.01)
α-D-lactose	0.01 (±0.01)	0.01 (±0.01)	0.01 (±0.00)	0.02 (±0.02)	0.03 (±0.02)	0.01 (±0.01)
D,L-α-glycerol phosphate	0.02 (±0.01)	0.01 (±0.00)	0.02 (±0.00)	0.01 (±0.01)	0.14 (±0.06)	0.03 (±0.02)
D-malic acid	0.01 (±0.01)	0.10 (±0.11)	0.01 (±0.01)	0.14 (±0.22)	0.75 (±0.85)	0.04 (±0.00)
Putrescine	0.01 (±0.01)	0.44 (±0.28)	0.00 (±0.00)	0.25 (±0.21)	0.38 (±0.51)	0.02 (±0.02)
Nb substrats	3	11	5	18	19	1

a.



b.

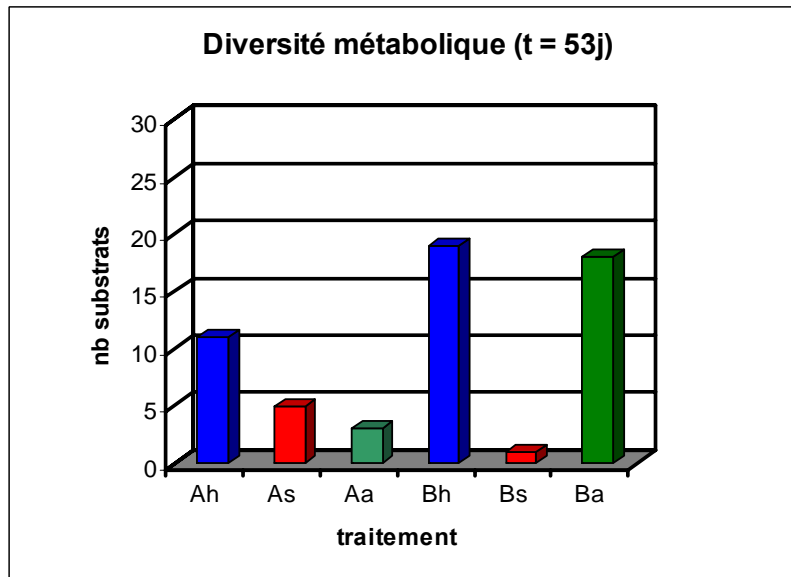


Fig. 10. Evolution de la diversité métabolique du sédiment

IV- Discussion

Au cours de ce travail, nous avons cherché à évaluer dans quelle mesure l'application de différents traitements hydriques peut affecter les fonctions microbiennes de dénitrification et de respiration dans deux sédiments d'un étang semi-permanent de Camargue. Il est connu que la teneur en eau des sédiments est un facteur de régulation important des activités microbiennes. En effet, elle conditionne la disponibilité en oxygène pour les microorganismes. Lorsque le sédiment est saturé en eau, le milieu devient anoxique et des accepteurs d'électrons autres que l'oxygène peuvent être utilisés au cours de processus respiratoires anaérobies tels que la dénitrification. Lorsque la teneur en eau permet la diffusion de l'oxygène, la respiration aérobie est possible. Par ailleurs, les variations de teneur en eau vont influencer d'autres paramètres du sédiment (diffusion des nitrates, minéralisation, nitrification qui produit les nitrates nécessaires à la dénitrification, etc.).

IV.1- Evolution de la teneur en nitrates (Fig. 7)

Les teneurs en nitrate étaient similaires en début d'incubation entre les 2 sédiments. On a observé une augmentation progressive de la teneur en nitrate dans le sédiment A qui s'assèche (As). Cette augmentation est une évolution classique au cours de l'assèchement dans les systèmes hydromorphes. L'augmentation de la disponibilité en N inorganique est une conséquence de la minéralisation de l'azote issu de la matière organique du sédiment (Olde Venterink *et al*, 2002). La teneur en nitrate du sédiment A a augmenté malgré le temps d'incubation assez court (53 jours). On peut en déduire que l'assèchement a permis une remise en fonction rapide de la communauté microbienne nitrifiante puisqu'il s'agit d'un sédiment habitué à l'alternance entre période d'inondation (phase aérobie) et d'exondation (phase anaérobie). Au contraire, pour le sédiment B qui n'est pas habitué à l'alternance (jamais asséché, donc ne connaissant jamais de conditions

favorables à la nitrification), on n'observe pas d'augmentation de la teneur en nitrate lors de l'assèchement (Bs), alors que ce traitement devrait être favorable à la communauté nitrifiante. Une explication possible serait que les conditions d'incubation (temps, vitesse de dessiccation) n'ont pas permis une activation de cette communauté.

Par contre, le sédiment B qui a été asséché puis réhumecté (Ba) a présenté une augmentation de la teneur en nitrate après la deuxième période d'assèchement ($t = 53$ jours). Dans ce cas, on peut supposer que l'alternance due au traitement (dessiccation / réhumectation/ dessiccation) a pu rendre fonctionnelle la communauté nitrifiante, permettant l'accumulation de nitrate.

IV.2- Evolution comparée de la dénitrification potentielle et de la teneur en nitrate des sédiments (Fig. 7 et 8)

Le sédiment A présente un potentiel de dénitrification stable qu'on le maintienne sous eau ou qu'on le laisse s'assécher (valeurs comparables pour Ah et As). On s'attendait à ce que l'assèchement du sédiment entraîne une diminution du potentiel de dénitrification par suite de la diminution de la teneur en eau. Malgré l'augmentation de la teneur en nitrate de As au cours de l'incubation, on n'observe pas d'augmentation du potentiel de dénitrification, probablement à cause des conditions défavorables (très faible teneur en eau) à ce processus. Le maintien du potentiel de dénitrification dans As peut s'expliquer par le fait que ce sédiment (et la communauté microbienne dénitrifiante qui y réside) est habitué à l'alternance.

Ce n'est pas le cas pour le sédiment B pour lequel un assèchement expérimental entraîne des variations significatives du potentiel de dénitrification (Bs): lors de la phase initiale de l'assèchement, le potentiel de dénitrification augmente puis, lorsque la teneur en eau du sédiment devient très faible, le potentiel de dénitrification chute (conditions défavorables à ce processus). Ce sédiment B n'est pas habitué à des phases de dessiccation : la communauté dénitrifiante qui y réside

supporte donc mal cette dessiccation. Une dessiccation complète du sédiment peut provoquer la mort des bactéries, une diminution de l'activité microbienne et l'arrêt de tous les processus microbiens comme la dénitrification potentielle (Baldwin & Mitchell, 2000).

Dans le cas d'une alternance expérimentale assèchement / réhumectation / assèchement (traitements a), la réhumectation (retour à des conditions favorables à la dénitrification) se traduit:

- dans le sédiment A, par une augmentation significative du potentiel de dénitrification probablement suite à la dessiccation qui provoque une forte minéralisation de la matière organique (production d'azote inorganique mis à disposition de la communauté microbienne lors de la réhumectation).
- dans le sédiment B : par une augmentation du potentiel de dénitrification qui atteint des valeurs comparables aux valeurs initiales (avant assèchement) d'une part et aux valeurs obtenues pour le sédiment maintenu sous eau (Bh). Ceci démontre que lors de la réhumectation, la communauté microbienne a récupéré sa fonctionnalité (capacité de dénitrification) : on peut alors parler de résilience de la fonction après le stress de l'assèchement et le retour à des conditions « normales ».

Nos résultats montrent que le potentiel de dénitrification dépend à la fois des conditions hydriques (saturation en eau) et de la présence de nitrates, qui dépend elle-même des processus de minéralisation et de nitrification. Cette constatation est en accord avec des résultats obtenus en conditions simplifiées (le plus souvent culture pure de microorganismes) et reportés dans la littérature qui montrent que nitrate, oxygène et teneur en eau sont les facteurs les plus directement impliqués dans l'induction de la synthèse des réductases de la dénitrification (Tiedje, 1988).

IV.3- Evolution comparée de la respiration potentielle et de la diversité fonctionnelle (Fig. 9, Fig. 10 et tableau 2)

Les sédiments maintenus sous eau (Ah et Bh) ont présenté une activité de respiration potentielle relativement stable tout au long de l'expérience : la stabilité de cette fonction est probablement due à la stabilité des conditions d'incubation puisque ces sédiments ont été prélevés sous eau et maintenus en permanence sous eau tout au long de l'expérience. En parallèle on observe que la diversité métabolique reste relativement élevée dans les microcosmes Ah et Bh par rapport à celle des microcosmes soumis à l'assèchement (As et Bs) en fin d'incubation.

La disponibilité en eau constitue un facteur important qui affecte la physiologie microbienne globale (Holden & Fierer, 2005). Dans nos expériences, l'activité de respiration potentielle a significativement diminué lors de la phase initiale d'assèchement (jusqu'à $t = 26$ jours) pour les traitements a et s. On peut en déduire que l'assèchement affecte rapidement les capacités de respiration aérobie du sédiment (respiration potentielle), et ce, dans les zones A et B. Au cours de notre expérience, dès le $t = 11$ jours, le taux d'humidité dans les sédiments soumis à dessiccation atteint des valeurs faibles (environ 60% pour A et 40% pour B), inférieures à la valeur de taux d'humidité optimale pour la respiration (80%).

Cette diminution de l'activité de respiration potentielle lors de l'assèchement s'est accompagnée d'une diminution de la diversité métabolique observée en fin d'incubation (As et Bs). L'assèchement semble avoir provoqué la mort (ou l'inactivation) d'une proportion importante de la communauté microbienne ce qui a conduit à une diminution importante de la diversité métabolique. L'augmentation du potentiel de respiration à $t = 34$ jours pour le traitement Bs est difficilement explicable et probablement due à un problème lors des expérimentations : on aurait attendu que les valeurs de respiration potentielle restent faibles pour ce traitement.

Les potentiels de respiration aérobie des deux sédiments ont globalement répondu différemment aux traitements hydriques appliqués. Alors que la réhumectation (traitement a) a généré une réponse différente (comparé au traitement s) en termes de la réponse des sédiments A et B et en termes de respiration potentielle (comparaison traitements a et s). Ces résultats suggèrent que l'assèchement du sédiment a altéré de manière irréversible (en tout cas dans le laps de temps de notre expérience) la communauté microbienne hétérotrophe aérobie (responsable de la respiration). La réhumectation, pour le sédiment A (Aa) ne permet pas de récupérer un potentiel de respiration comparable au traitement Ah. La diversité métabolique a répondu de façon très similaire : la diversité métabolique du sédiment A est restée très faible pour le traitement avec réhumectation alors que ce même traitement a paru stimuler la diversité métabolique du sédiment B en fin d'incubation.

La séquence assèchement progressif - réhumectation peut induire la lyse d'une proportion significative de la biomasse microbienne, et peut directement ou indirectement avoir un impact sur la composition de la communauté microbienne (Fierer *et al.*, 2003). Cet impact pourrait se traduire par une altération de la diversité métabolique de la communauté microbienne et de ses fonctions.

En fin d'expérience, les potentiels de respiration pour les sédiments soumis à l'alternance assèchement – réhumectation – assèchement (traitement a) étaient plus faibles que ceux des sédiments soumis à un seul assèchement (traitement s) (significatif pour A, tendance pour B). Tout se passe comme si deux stress (assèchements) successifs appliqués aux sédiments aggravaient plus le potentiel de respiration qu'un seul assèchement. Toutefois, nous allons voir que les données de diversité métabolique suggèrent que cette réponse à l'alternance dépend du type de sédiment. Parallèlement à l'augmentation de l'activité de respiration potentielle pour les microcosmes Aa et Ba, on observe en fin d'incubation à T = 53 jours que la diversité métabolique des microcosmes Ba est restée à niveau relativement élevé. Par contre celle des microcosmes Aa a fortement diminuée. Ce résultat pourrait se traduire par une capacité du sédiment B à la résilience que ce soit au niveau de la fonction en elle-même ou dans la diversité fonctionnelle. A l'inverse, le sédiment A est

manifestement peu capable de récupérer son niveau initial tant en ce qui concerne l'intensité de la fonction que le niveau de la diversité fonctionnelle.

IV-4 Comparaison des deux sédiments

Bien que prélevés dans un même étang et à faible distance, les deux sédiments A et B présentaient des caractéristiques physico-chimiques différentes et ont répondu différemment aux traitements hydriques appliqués.

Plusieurs explications peuvent être proposées :

- le sédiment B est plus riche en matière organique. Il est connu que les sédiments riches en matière organique récupèrent plus facilement leurs fonctions après perturbation que des sédiments pauvres en matière organique. Cette récupération fonctionnelle reflète une meilleure résistance des communautés microbiennes aux perturbations (Girvan *et al*, 2005), tel le stress physiologique provoqué par l'assèchement dans notre étude.
- Les conditions naturelles que connaît le sédiment A (passage de phases sous eau à faible température en hiver à des phases d'assèchement complet à des températures très élevées en été) constituent probablement un stress important pour les communautés microbiennes qui y résident. Ces communautés, très perturbées seraient plus vulnérables (comparées à celles du sédiment B qui connaissent des conditions stables) à un stress tel que l'assèchement expérimental appliqué lors de notre expérience.

Les données de diversité métabolique vont dans ce sens puisque le sédiment B présente une diversité métabolique globalement plus importante que le sédiment A et les processus de dénitrification et de respiration semblent moins affectés (ou semblent mieux récupérer) que pour le sédiment A. Il est en effet connu qu'une grande diversité de la communauté microbienne (dans

notre cas : diversité fonctionnelle) garantit une meilleure stabilité des fonctions microbiennes en réponse à une perturbation (notion de redondance fonctionnelle) (Nannipieri *et al*, 2003).

V- Conclusion et Perspectives

Les 3 conclusions majeures de notre étude sont les suivantes : (1) une variation des conditions hydriques peut affecter, à court terme, les fonctions potentielles de respiration et de dénitrification du sédiment étudié, (2) ces changements d'intensité des fonctions potentielles sont accompagnés de modifications de la diversité fonctionnelle des microorganismes et (3) la réponse des fonctions et des communautés microbiennes à des assèchements constants ou alternés dépend du fait qu'il provienne d'une zone en permanence inondée ou d'une zone soumise à des alternances inondation / exondation.

Une analyse critique de chacun de ces 3 points ainsi que les perspectives en découlant sont développées ci-dessous:

(1) une variation des conditions hydriques peut affecter, à court terme, les fonctions potentielles de respiration et de dénitrification du sédiment étudié

Respiration et dénitrification sont affectées de manière sensiblement différente par les modifications hydriques imposées : la dénitrification n'est pas affectée par un processus progressif d'assèchement alors que la respiration est très rapidement ralentie. A l'inverse, la séquence inondation / assèchement / réhumectation / assèchement stimule fortement la dénitrification mais n'affecte pas la respiration (les traitements Ah et Bh étant pris systématiquement comme référence). Si l'on se replace dans le contexte général de ce travail, à savoir déterminer l'impact de changements globaux sur les processus producteurs de gaz à effet de serre, ces constatations rendent le problème complexe. En effet, dans le cas présent, l'impact global des changements environnementaux résultera d'un compromis entre des processus non, positivement ou négativement affectés.

Les points suivants restent néanmoins inexpliqués ou critiquables :

- les interprétations auraient probablement pu être renforcées si la durée de l'expérience avait été supérieure à 2 mois,
- l'augmentation de la respiration potentielle dans les échantillons en assèchement progressif de la zone B est difficile à expliquer autrement que par un artefact expérimental,
- Un défaut d'homogénéisation initiale de chaque lots de sédiment peut être à l'origine d'un manque de répétabilité (erreurs standard importante) des analyses dans certains cas (ex : respiration potentielle de la zone B).

Nous utilisons l'évolution des teneurs en nitrate comme élément d'explication de l'évolution de la capacité de dénitrification. Cependant, outre que les mesures auraient dû être plus fréquentes (notamment autour de la date de réhumectation des échantillons) il faut noter que les teneurs en nitrate mesurées résultent de la différence entre la quantité de nitrate produits (nitrification) et la quantité de nitrate consommés (dénitrification). Il est donc difficile d'interpréter les résultats de dénitrification potentielle en fonction des teneurs en nitrate puisque que le processus de dénitrification consomme des nitrates. Dans une étude plus longue, il aurait été intéressant de caractériser aussi les potentiels de nitrification des sédiments pour affiner cette relation.

(2) ces changements d'intensité des fonctions potentielles sont accompagnés de modifications de la diversité fonctionnelle des microorganismes

L'analyse de la diversité (fonctionnelle et/ou taxonomique) des microorganismes permet une mise en perspectives des mesures de capacités fonctionnelles. En effet, il est évident que la gravité avec laquelle le système est affectée ne sera pas la même en fonction du fait que les modifications fonctionnelles s'accompagnent ou non de modifications de la structure de la communauté. La technique utilisée dans ce travail est critiquable à 2 titres : (1) elle implique une phase de croissance des microorganismes, alors qu'une faible fraction d'entre eux est cultivable et (2) on peut assez directement l'associer à la respiration mais seulement très indirectement à la dénitrification. Les

analyses de diversité génétique de la communauté microbienne globale n'ont pas pu être faites faute de temps, mais ces données seront rapidement disponibles. Elles seront complétées par l'analyse de la diversité génétique des microorganismes dénitrifiants, basées sur les gènes de fonction (*narG*, *nirS*).

Par ailleurs, 3 variables sont importantes pour étudier la résistance et la résilience des communautés microbiennes : fonctionnalité et diversité (2 des variables mesurées) mais également densité ou nombre. A titre d'exemple, dans notre travail, les interprétations en termes de mortalité des microorganismes ne sont, par définition, que spéculatives. Le temps imparti ne permettait pas d'envisager de telles mesures. En effet le dénombrement direct (par microscopie à épifluorescence), seul à même d'apporter le degré de précision nécessaire, aurait été beaucoup trop long.

(3) la réponse des fonctions et des communautés microbiennes à des modifications hydriques dépend du fait qu'il provienne d'une zone en permanence inondée ou d'une zone soumise à des alternances (inondation / exondation).

L'importance de l'usage passé des milieux dans leur fonctionnement actuel et leurs modalités de réponse à des stress est un aspect de plus en plus étudié. En effet, Il permet de croiser les 2 « facteurs de forçage » évoqués en introduction, à savoir les modes d'utilisation des terres et les changements climatiques. Dans notre cas, cet aspect est bien illustré. A titre d'exemple, le potentiel de dénitrification des sédiments A et B a été affecté par les traitements appliqués lors de l'expérience. Pour un sédiment habitué à l'alternance (A), l'assèchement seul n'a pas suffi à altérer ce potentiel alors que pour un sédiment toujours sous eau, l'assèchement semble constituer un stress important puisque le potentiel est affecté. Une alternance expérimentale a stimulé le potentiel de dénitrification dans les deux sédiments. Ces résultats montrent que l'histoire du sédiment conditionne sa résistance à un stress d'assèchement.

Glossaire

A

Acétylène : Hydrocarbure gazeux, obtenu en traitant le carbure de calcium par l'eau.

Anthropisation : Effet de l'action humaine sur les milieux naturels.

Artefact : Phénomène d'origine artificielle ou accidentelle, que l'on rencontre au cours d'une observation ou d'une expérience scientifique.

Atropine : Alcaloïde extrait de la belladone, utilisé pour dilater la pupille de l'œil et pour combattre les spasmes.

B

Biodiversité : Diversité des espèces vivantes ; diversité au sein des espèces.

Biosphère : Ensemble des régions de la Terre où l'on rencontre des êtres vivants : La biosphère est constituée de portions de l'atmosphère, de l'hydrosphère et de la lithosphère.

D

Dessiccation : Élimination de l'humidité d'un corps.

E

Écosystème : Ensemble formé par des êtres vivants (biocénose) et l'environnement dans lequel ils vivent (biotope).

Effet de serre : Effet naturel de la basse atmosphère (troposphère), qui contribue à retenir une partie de la chaleur solaire à la surface de la Terre, par le biais du pouvoir absorbant de certains gaz.

Étain : Métal blanc, brillant, très malléable.

H

Hélium : Gaz très léger et ininflammable, utilisé pour gonfler les ballons et les aérostats.

R

Réhumecter : remouiller légèrement.

S

Sédiment : accumulation naturelle de matières minérales déposées par les eaux, les glaciers, le vent ou d'autres agents physiques.

Bibliographie

Baldwin, D. S. and A. M. Mitchell. 2000. The effects of drying and re-flooding on the sediment and soil nutrient dynamics of lowland river-floodplain systems: A synthesis. *Regulated Rivers: Research and Management*. **16**:457-467.

Beare MH, C.L. Neely, D.C. Coleman, et W.L. Hargrove. 1990. A substrate-induced respiration (SIR) method for measurement of fungal and bacterial biomass on plant residues. *Soil Biology Biochemistry*. **22** (5): 585-59.

Beare MH, C.L. Neely, D.C. Coleman, et W.L. Hargrove. 1991. Characterization of a substrate-induced respiration method for measuring fungal, bacterial and total microbial biomass on plant residues. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. **34**: 65-73.

Bergner B., J. Johnstone and K. K. Treseder. 2004. Experimental warming and burn severity alter soil CO₂ flux and soil functional groups in a recently burned boreal forest. *Global Change Biology*. **10**:1996-2004.

Bouwman, A. F., K. W. Van der Hoek and J. G. J. Olivier. 1995. Uncertainties in the global source distribution of nitrous oxide. *Geophysical Research Journal*. **100** (D2): 2785-2800.

Brinson M.M. and A.I Alvarez. 2002. Temperate freshwater wetlands: types, status, and threats. *Environ. Conserv.* **29**: 115-133.

Brumme, R., W. Borken and S. Finke. 1999. Hierarchical control on nitrous oxide emission in forest ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles*. **13**: 1137-1148.

Cavigelli, M. A. and Robertson. 2000. The functional significance of denitrifier community composition in a terrestrial ecosystem. *Ecology*. **81** (5): 1402-1414.

D'Angelo, E. M. and K. R. Reddy. 1999. Regulators of heterotrophic microbial potentials in wetland soils. *Soil Biology and Biochemistry*. **31**:815-830.

Fierer, N., J.P. Shimel, and P.A. Holden. 2003. influence of drying rewetting frequency on soil bacterial community structure. *Microb. Ecol.* **45**:63-71.

Finlayson M. and M. Moser. 1991. *Wetlands. Facts on File.* Oxford, UK. 224 p.

Firestone, M. K. and E. A. Davidson. 1989. Microbial basis of NO and N₂O production and consumption in soil. *Exchange of Trace Gases between Terrestrial Ecosystems and the Atmosphere.* D. S. Shimel, John Wiley & Sons: 7-21.

Firth J. R. and C. Edwards.1999. Effects of cultural conditions on denitrification by *Pseudomonas stutzeri* measured by Membrane Inlet Mass Spectrometry. *Journal of Applied microbiology*.**87**: 353-358.

Fromin, N., B. Montuelle, R. Dupont, C. Escape, R. Joffre, J. M. Ourcival, D. Serca, G. Pinay, R. Lensi. 2005. Impact des régimes hydrologiques et des modes d'utilisation des terres sur les processus microbiens à l'origine d'émissions de gaz à effet de serre. Rapport de recherche. 6 p.

Gamble T. N., M. R. Betlach and J. M. Tiedje.1977. Numerically Dominant Denitrifying Bacteria from World Soils. *Appl Environ Microbiol.* **33**(4): 926-939.

Girvan, M. S., C. D. Campbell, K. Killham, J. I. Prosser and L. A. Glover. 2005. Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environmental Microbiology*. 7(3):301-313.

Heal, O. W., S. Struwe and A. Ibrahima. 1996. Diversity of soil biota and ecosystem function. *Global change and terrestrial ecosystems*. W. Steffen. Cambridge, Cambridge University Press: 385-402.

Holden, P. A., and N. Fierer. 2005. Microbial processes in the vadose zone. *Vadose Zone Journal*. 4:1-21

Houghton, J. T. 1997. *Global Warming. The complete briefing*. New York, Cambridge University Press.

Houghton, J. T., L. G. Meira Filho, B. A. Callandar, N. Harris, A. Kattenberg and K. Maskell. 1996. *Climate change: the science of climate change*. New York, Cambridge University Press.

Khalil K., P. Renault, N. Guérin and B. Mary. 2005. Modelling denitrification including the dynamics of denitrifiers and their progressive ability to reduce nitrous oxide: comparison with batch experiments. *European Journal of Soil Science*. 56 (4): 491–504.

Leclerc H., R. Buttiaux, J. Guillaume et P. Wattre. *Microbiologie appliquée*. 1977. Doin éditeurs. 80-82 p.

Lensi Robert. 2003. Programme National / ACI – FNS : ECCO » ECOSPHERE CONTINENTAL : Processus et Modélisation.

Lensi, R., A. Clays-Josserand, and L. Jocteur Monrozier. 1995. Denitrifiers and denitrifying activity in size fractions of a mollisol under permanent pasture and continuous cultivation. *Soil Biol. Biochem.* **27**: 61-69.

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

Luo, J., R. E. White, P. Roger Ball and R. W. Tillman. 1996. Measuring denitrification activity in soils under pasture: Optimizing conditions for the short-term denitrification enzyme assay and effects of soil storage on denitrification activity. *Soil Biology Biochemistry.* **28**(3): 409-417.

Matson, P. A. and P. M. Vitousek. 1990. Ecosystem approach to a global nitrous oxide budget. *Bioscience.* **40**: 667-672.

McClain, M. E., E. W. Boyer, L. Dent, S. E. Gergel, N. B. Grimm, P. M. Groffman, S. C. Hart, J. W. Harvey, C. A. Johnston, E. Mayorga, W. H. McDowell and G. Pinay. 2003. Biogeochemical hot spots and hot moments at the interface of terrestrial and aquatic ecosystems. *Ecosystems.* **6** : 301-312.

McGuirl M. A, Nelson L. K., Bollinger J. A., Chan W-K and Dooley D. M. 1998. The *nos* (nitrous oxide reductase) gene cluster from the soil bacterium *Achromobacter cycloclastes*: Cloning, sequence analysis, and expression. *Journal of Inorganic Biochemistry.* **70**: (3-4) 155-169.

Meyer, O. 1993. Functional groups of micro-organisms. Biodiversity and ecosystem function. H. A. Mooney. Berlin, Springer: 67-96.

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

National Wetlands Working Group. 1997. The Canadian Wetland Classification System. Edited by B.G. Warner and C.D.A. Rubec. 1 p.

Navid D. 1989. The international law of migratory species: The Ramsar Convention. Natural Resources Journal. **29**: 1001-1016.

Olde Venterink, H., T. E. Davidsson , K. Kiehl and L. Leonardson. 2002. Impact of drying and re-wetting on N, P and K dynamics in a wetland soil. Plant and Soil. **243**: 119-130.

Parkin, T. B. 1987. Soil microsites as a source of denitrification variability. Soil Science Society of America Journal. **51**: 1194-1199.

Parry S., P. Renault, J. Chadoeuf, C. Chenu and R. Lensi. 2001. Particulate organic matter as source of variation in denitrification in clods of soil. European Journal of Soil Science. **51**: 271-281.

Pelmont J. Bactéries et Environnement. 1995. OFFICE DES PUBLICATIONS UNIVERSITAIRES. 576 p, 719 p.

Perry J. J., Staley J. T., Lory S. 2004. MICROBIOLGIE – Cours et questions de révision. DUNOD. 616-617 p, 619 p.

Pfeifle, G., C. Mays et M. Poumadere. 2004. Changement climatique, augmentation du niveau de la mer et (ré)-action des parties prenantes : Etude de cas à l'aide d'un scénario catastrophe en Camargue. Rapport de recherche. 8 p.

Phillipot L. and S. Hallin. 2005. Finding the missing between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. *Current Opinion Microbiology*. **8(3)**: 234-239.

Rosimeiry P. and Rademacher I. 2001. A dynamic model of patterns of deforestation and their effect on the ability of the Brazilian Amazonian to provide ecosystem services. *Ecological Modelling*. **143**: 115-146.

Sala O.E., F.S. 3rd Chapin, J.J. Armesto , E. Berlow , J. Bloomfield , R. Dirzo , E. Huber-Sanwald , L.F. Huenneke, R.B. Jackson , A. Kinzig , R. Leemans , D.M. Lodge , H.A. Mooney , M. Oesterheld , N.L. Poff , M.T. Sykes , B.H. Walker , M. Walker , D.H. Wall . 2000. Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science (Washington)*. **5459(287)**:1770-1774.

Schimel D. S. 1995. Terrestrial ecosystems and the carbon cycle. *Global Change Biology*. **1**: 77-91.

Stokstad, E. 2005. Ecology – Taking the pulse of earth's life-support systems. *Science*. **308(5718)**:41-43.

Tiedje, J. M. 1982. Denitrification, p. 1011-1024. *In* A. L. Page, R. H. Miller, and D. R. Keeney (ed.), Methods of soil analysis. Part 2 – Chemical and microbiological properties, Pt 2, Agronomy Monograph No. 9, American Society of Agronomy, Madison, Wis. USA.

Tiedje J.M. 1988. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. *In* Biology of anaerobic microorganisms; Zehnder A.J.B. (Ed.). Wiley J. & Sons. 179-244.

Velasquez, E., P. Lavelle, E. Barrios, R. Joffre and F. Reversat.2005. Evaluating soil quality in tropical agroecosystems of Colombia using NIRS. *Soil Biology & Biochemistry*.**37**: 889-898.

Wigand C., R. A. McKinney, M. M. Chintala, M. A. Charpentier, and P. M. Groffman. 2004. Denitrification Enzyme Activity of Fringe Salt Marshes in New England (USA). *Journal of Environment Quality*. **33**: 1144–1151.

Zoltai S. C. and D. H. Vitt.1995. Canadian wetlands: Environmental gradients and classification. *Plant Ecology*. **118**(1-2): 131-137.

Autres références

Encarta [CD]. 2006. Camargue.

Universalis [CD]. 2003. Le cycle de l'azote.

Webographie

Germon J-C et Y. Couton. 1999. La dénitrification dans les sols – Régulation de son fonctionnement et application à la dépollution. Le Courrier de l'environnement. 38 p. URL

<http://www.inra.fr/dpenv/germoc38.htm>

Peytavin C. et J-M Engasser. 1995. Nitrate and nitrite reduction in *Pseudomonas stutzeri* cultures: kinetic studies, modeling and simulation of a denitrifying system. CNRS – Travaux universitaires.

URL

<http://cat.inist.fr>

Phillipot L. et R. Lensi. 1997. Rôle d'une fonction microbienne dans l'écologie des micro-organismes du sol.: Valeur sélective des gènes de la dénitrification. CNRS – Travaux universitaires. URL

<http://cat.inist.fr>

Suzuki D. 2005. Ecosystem assessment provides baseline. URL

<http://www.millenniumassessment.org/en/index.aspx>

<http://www.maweb.org/en/index.aspx>

<http://www.millenniumassessment.org/en/index.aspx>

<http://museum.agropolis.fr/pages/savoirs/camargue/vianet.pdf>

http://www.eon2000plus.espaces-naturels.fr/indicateurs_CAMARGUE.htm

http://www.mapsworld.com/lat_long/france-lat-long.html

http://www.ramsar.org/key_conv_f.htm