



HAL
open science

Effets des éléments nutritifs sur les communautés bactériennes planctoniques du lac d'Annecy

Nicolas Akin

► **To cite this version:**

Nicolas Akin. Effets des éléments nutritifs sur les communautés bactériennes planctoniques du lac d'Annecy. [Stage] France. Université Claude Bernard Lyon 1 (UCBL), Villeurbanne, FRA.; Institut National des Sciences Appliquées de Lyon (INSA Lyon), Lyon, FRA.; Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon (ENVL), Lyon, FRA. 2006, 26 p. hal-02818392

HAL Id: hal-02818392

<https://hal.inrae.fr/hal-02818392>

Submitted on 6 Jun 2020

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

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



MASTER Spécialité RECHERCHE



Effets des éléments nutritifs sur les communautés bactériennes planctoniques du lac D'Annecy

AKIN Nicolas

MAITRE DE STAGE : TADONLEKE Rémy

LABORATOIRE D'ACCUEIL :



INRA Thonon Les Bains
75 Avenue de Corzent
74100 Thonon Les Bains



Université
Claude
Bernard Lyon 1



Ecole Nationale
Vétérinaire
de Lyon



Remerciements

Je tiens à remercier mon maître de stage, Rémy Tadonlécé, chargé de recherche à la station, pour la formation très enrichissante et l'aide qu'il m'a apporté tout au long de ce stage.

Je tiens également à remercier, Agnès Bouchez, animatrice de l'équipe écologie microbienne aquatique, pour son accueil au sein de l'équipe.

Brigitte Leberre et Aurélie Villeneuve m'ont aidé en biologie moléculaire, je leurs fait part de toute ma gratitude.

Je remercie également ma sœur qui m'a supporté, avec la plus grande patience, et qui m'a soutenu durant ces six mois.

Je voudrais également saluer tous les habitants du château et mes collègues qui partageaient le bureau avec moi.

Enfin, je voudrais terminer ces remerciements par une pensée envers mes parents qui m'ont apporté tout leur soutien depuis le début.

Abréviations

Bactéries HNA : bactéries au contenu élevé en acides nucléiques (High nucleic acid).

Bactéries LNA : bactéries au contenu faible en acides nucléiques (Low nucleic acid).

FL1 : Intensité de la fluorescence verte mesurée au cytomètre.

SSC : Side Scatter. Déviation de la lumière par la cellule sur un angle de 90°. Paramètre mesuré par le cytomètre.

EDTA : acide éthylènediaminotétraacétique sel disodique. Agent chélateur des cations bivalents, il inhibe ainsi les DNAses.

SDS : sodium dodecyl sulfate. Détergent anionique fort, il permet la désorganisation de la membrane cellulaire par dénaturation des protéines membranaires.

PCR : Polymerase chain reaction.

APS : Persulfate d'ammonium, agent initiateur de la polymérisation des gels de polyacrilamide.

TEMED : Tétraméthylènediamine, agent accélérateur de la polymérisation des gels de polyacrilamide.

SICRLA/SILA : Syndicat intercommunal des communes riveraines du lac d'Annecy/
Syndicat intercommunal du lac d'Annecy.

SOMMAIRE

I Introduction	page 1
II Matériel et méthodes	page 2
1. Caractéristiques du lac échantillonné	page 2
2. Prélèvement des échantillons et protocole expérimental	page 3
a. Prélèvements	
b. Protocole expérimental	
3. Analyses des échantillons	page 4
a. Détermination des abondances bactériennes	
b. Détermination de la composition bactérienne	
III Résultats	page 7
1. Effets des différents nutriments sur les abondances bactériennes	page 7
2. Effets des différents nutriments sur la composition bactérienne	page 9
IV Discussion	page 10
1. Effets des nutriments sur les abondances bactériennes	page 10
2. Effets des nutriments sur la composition bactérienne	page 12
V Conclusion	page 13

INTRODUCTION

Les bactéries des milieux aquatiques sont très impliquées dans les cycles biogéochimiques ; de par leur rôle dans le recyclage de la matière et dans son transfert vers les niveaux trophiques supérieurs.

L'introduction des techniques de biologie moléculaire et de cytométrie dans le domaine de l'écologie microbienne aquatique a permis de mettre en évidence la grande diversité phylogénétique et l'hétérogénéité physiologique des communautés bactériennes aquatiques. Des études ont permis de constater que les facteurs tels que la matière organique, la prédation et les conditions chimiques du milieu jouaient un rôle dans la structuration de ces communautés. Cependant, peu d'études ont évalué les effets directs des éléments nutritifs sur les diversités phylogénétique et physiologique (structure en activité) de ces communautés (Fisher et *al.* 2000 ; Schäfer et *al.* 2001). Pourtant, il est connu que l'enrichissement des écosystèmes aquatiques en éléments nutritifs (phosphore et azote) est responsable du processus d'eutrophisation (OCDE, 1982). De plus, il est connu que l'azote et le phosphore limitent souvent les communautés bactériennes prises dans la globalité (Toolan et *al.* 1991 ; Coverney et Wetzel 1992). Par ailleurs, la proportion de bactéries au contenu en acides nucléiques élevé, considérées comme étant parmi les plus actives, varie avec l'environnement (Li et *al.* 1995 ; Gasol et *al.* 1999 ; Lebaron et *al.* 2001 ; Tadonleke et *al.* 2005). Même si des travaux indiquent que les éléments nutritifs jouent un rôle dans l'augmentation des proportions de ces bactéries, l'effet des concentrations croissantes de nutriments sur l'hétérogénéité physiologique des communautés bactériennes aquatiques n'a que rarement été testé.

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet direct de différents éléments nutritifs inorganiques et organiques, ainsi que de l'augmentation des concentrations de phosphore sur (i) l'abondance et la proportion des bactéries au contenu en acides nucléiques élevé et (ii) sur la diversité phylogénétique bactérienne en milieu lacustre.

MATERIELS ET METHODES

1. Caractéristiques du lac échantillonné

Les échantillons d'eau utilisés dans ce travail ont été prélevés dans le lac d'Annecy. Ce lac se situe dans la ville d'Annecy (Latitude : 45°54' N ; 6°07'E) et présente la particularité d'être pauvre en éléments nutritifs (Viboud et Fontvieille 1999). Ses caractéristiques morphométriques sont résumées dans le tableau 1 (http://www.environnement.gouv.fr/rhone-alpes/lacs_rha/lacs_annecy.htm).

Tableau 1. Caractéristiques morphométriques du lac d'Annecy.

Surface du plan d'eau (ha)	2 650
Longueur maximale (m)	14 600
Largeur maximale (m)	3 100
Altitude (m)	446.9
Profondeur maximale (m)	Grand lac : 64.7 Petit lac : 55.2
Profondeur moyenne (m)	41.5
Volume (en millions de m ³)	1 123
Temps de renouvellement	3.8 ans

Ce lac est important de par ses multiples usages : il est la principale source d'eau potable de la communauté annécienne, siège d'activités nautiques, lieu de pêche et important dans le paysage pour son attrait touristique.

Jusqu'en 1948, les eaux usées étaient souvent rejetées dans le lac sans traitement préalable ; ce qui a conduit à un enrichissement excessif de ses eaux en éléments nutritifs et à un accroissement important de la production algale (eutrophisation du milieu). En 1957, le Syndicat Intercommunal d'Assainissement des Communes Riveraines du Lac d'Annecy (SICRLA renommé SILA par la suite) fut créé et chargé de concevoir des moyens d'interception des effluents pollués. La mise en place d'un collecteur général de ceinture et le traitement de l'ensemble des eaux usées dans une station d'épuration, ont permis de restaurer la qualité des eaux du

lac et de les ramener à un état oligotrophe (c'est à dire pauvre en éléments nutritifs).

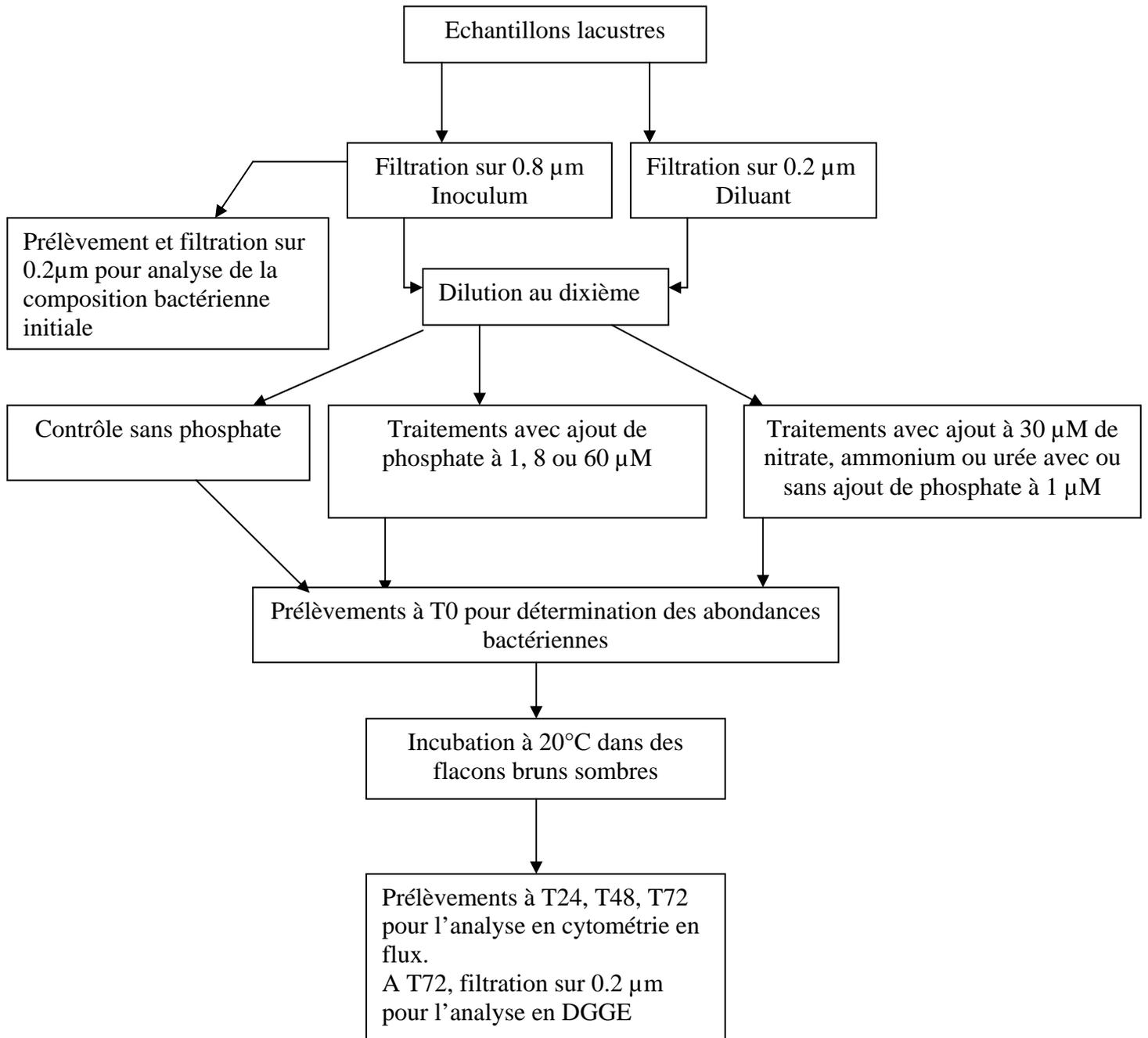


Figure 1 : Schéma synthétique du protocole expérimental

2. Prélèvement des échantillons et protocole expérimental

a. Prélèvement des échantillons

Les prélèvements ont eu lieu dans le grand lac à la profondeur de 3m aux dates suivantes : 21 février, 14 mars, 5 avril et 20 avril 2006.

Les échantillons d'eau ont été prélevés à la bouteille Van dorn, placés dans des bidons, conservés au froid dans des glacières, puis transportés au laboratoire.

b. Protocole expérimental

Une fois au laboratoire, une partie de l'eau échantillonnée (environ 2 L) a été filtrée à travers un filtre de 0.8 μm de porosité (figure 1) ; cette filtration permet l'élimination des prédateurs et des algues autotrophes, afin d'éviter qu'ils fournissent aux bactéries de la matière organique dissoute et des minéraux pendant les incubations expérimentales (Coverney et Wetzel 1992). Le filtrat ainsi obtenu représente l'inoculum bactérien.

Une autre partie de l'eau échantillonnée (environ 12 L) a été filtrée sur des membranes en fibres de verre GF/C puis sur des filtres de 0.2 μm de porosité. La première filtration réduit considérablement l'abondance cellulaire dans l'échantillon et minimise l'enrichissement du filtrat en nutriments lors de la filtration sur 0.2 μm . Cette dernière filtration permet d'obtenir théoriquement un filtrat dépourvu de cellules procaryotiques (Ammerman et al. 1984) représentant le diluant.

L'inoculum et le diluant, ainsi que l'eau brute ont été prélevés afin de déterminer la proportion de bactéries retenues sur les différents filtres.

Les deux filtrats ont ensuite été mixés de manière à obtenir une dilution d'un facteur 10 de l'inoculum par le diluant afin de permettre la croissance bactérienne.

Quatre séries d'expériences ont été réalisées pour les quatre dates de prélèvement. A chaque date, 7 ou 8 traitements à 3 réplicats chacun ont été préparés, dont un traitement sans addition de nutriment qui servait de contrôle. Dans les deux premières séries d'expériences, les enrichissements consistaient à ajouter du phosphore à 1 μM , 8 μM et 60 μM (sous forme de phosphate de potassium dibasique), respectivement dans les trois premiers traitements, du nitrate à 30 μM (sous forme de nitrate de calcium tétrahydraté) dans le 4^{ème} traitement, de l'ammonium à 30 μM (sous forme de chlorure d'ammonium) dans le 5^{ème} traitement et de l'urée à 30 μM dans le 6^{ème} traitement. Dans ces traitements enrichis en azote, le phosphore a été ajouté à 1 μM . Un traitement contrôle supplémentaire a été

préparé en conséquence. Les traitements étaient les mêmes dans les deux dernières séries d'expériences, sauf que le phosphore n'a pas été ajouté dans les traitements enrichis en azote. Par conséquent, le traitement contrôle adapté a été supprimé.

Les réplicats (500 mL) ont été constitués dans des flacons bruns sombres (ce qui empêche le développement d'organismes autotrophes pouvant éventuellement se retrouver dans le flacon) et mis à incuber 72h à 20°C en chambre de culture tournante.

Des prélèvements pour la détermination des abondances bactériennes en cytométrie en flux ont été effectués à T0 (juste après les enrichissements), T24, T48 et T72. Ces échantillons ont été fixés au formaldéhyde et conservés à 4°C jusqu'à l'analyse.

A T72, 300 mL de chaque flacon ont été filtrés sur des membranes de 0.2 µm de porosité qui ont été utilisées pour déterminer la composition des communautés bactériennes. Pour déterminer la composition initiale dans le milieu, une filtration du même type a été réalisée sur l'inoculum. Les filtres ont été conservés au congélateur à -20°C jusqu'à l'analyse.

3. Analyses des échantillons

a. Détermination des abondances bactériennes

Les abondances bactériennes ont été déterminées à l'aide de la cytométrie en flux. Brièvement, la cytométrie en flux est une technique permettant d'analyser les caractéristiques des cellules (taille relative, granulosité, activité etc...) prises individuellement, après marquage ou non de ces cellules à l'aide d'un fluorochrome, et passage devant un faisceau laser. Dans notre cas, le cytomètre utilisé est un appareil de marque Becton Dickinson muni d'un laser argon de longueur d'onde 488 nm.

Les cellules de nos échantillons expérimentaux préalablement fixées au formaldéhyde ont été marquées à l'aide du fluorochrome SYBR GREEN (1 µL/échantillon). Ce fluorochrome se fixe sur les acides nucléiques et a une meilleure affinité pour les ARN (bon indicateur d'activité cellulaire) que pour les ADN (Lebaron et *al.* 1998). Après ajout des billes pour la calibration et 15 minutes d'incubation à l'obscurité, les échantillons sont alors passés au cytomètre en utilisant le plus faible débit de l'appareil (~12 µL.min⁻¹). Les cytogrammes sont enregistrés avec pour variable Y la fluorescence verte (FL1) et pour variable X le paramètre SSC qui donne

la déviation des faisceaux par la cellule sur un angle de 90°C. On peut distinguer sur ces cytogrammes, des cellules bactériennes avec un contenu en acides nucléiques élevé (HNA) et des cellules bactériennes avec un contenu en acides nucléiques faible (LNA) (figure 2).

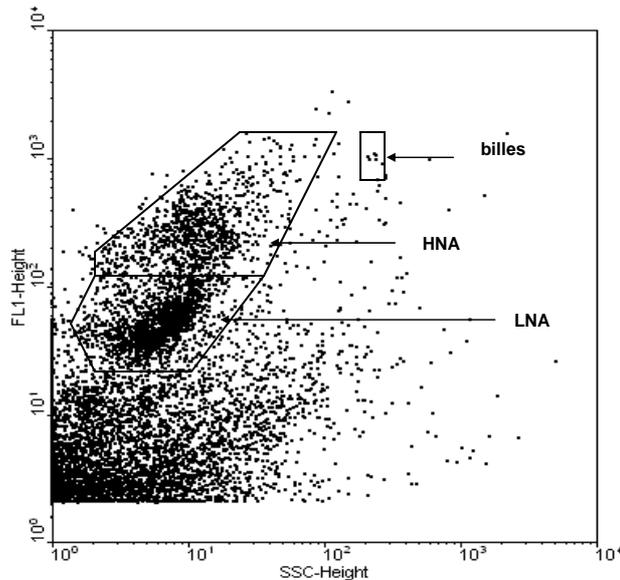


Figure 2. Cytogramme représentatif des groupes bactériens au contenu en acides nucléiques élevé (HNA) et faible (LNA) obtenu par l'analyse de l'eau brute du lac d'Annecy au cours de l'expérience 4.

b. Détermination de la composition bactérienne

Les modifications de la composition bactérienne suite aux enrichissements en nutriments ont été examinées à l'aide de la DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis). Un séquençage ultérieur des bandes majeures est prévu.

- Extraction et purification d'ADN

L'extraction d'ADN sur les filtres destinés à l'analyse de la composition bactérienne a été réalisée selon le protocole de Massana et *al.* (1997), avec une légère modification qui consistait à ne pas conserver les filtres dans le tampon de lyse à -20°C.

Cette extraction a été faite à l'aide de 750 μL d'un tampon de lyse (40 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl et 0.75 M saccharose) suivie d'une congélation de 15 min à -80°C . Après décongélation, 47 μL d'une solution de lysozyme (20000 U/mg, concentration finale de 2.4 mg/mL) ont ensuite été ajoutés aux échantillons. Les tubes contenant ces échantillons ont ensuite été exposés quelques secondes aux ultrasons. 75 μL d'une solution de SDS 10% et 10 μL d'une solution de protéinase K (20 mg/mL) ont été ajoutés et les tubes ont été placés au bain-marie à 55°C pendant 1h30. La purification des extraits a été réalisée au phénol-chloroforme-isoamyl alcool (25 : 24 : 1) et au chloroforme-isoamyl alcool (24 : 1) ; l'ADN récupéré dans la phase aqueuse après centrifugation (15000 rpm, 30 min, 4°C) a ensuite été précipité à l'éthanol absolu et à l'acétate de sodium (3 M, pH : 5.2) et conservé une nuit à -20°C .

Le lendemain, après décongélation, les extraits ont été lyophilisés à l'aide d'un évaporateur Speed Vac jusqu'à l'obtention d'un ADN sec repris ensuite dans un tampon TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8) ; le volume de tampon ajouté à l'ADN variait de 30 à 100 μL selon l'importance du culot d'ADN.

- Amplification PCR

A partir du dosage spectrophotométrique des solutions mères d'ADN extrait, des solutions filles de concentrations identiques de 30 ng/ μL ont été préparées.

L'amplification PCR a été réalisée à partir d'1 μL des solutions d'ADN filles pour 50 μL de produits PCR : 28.75 μL d'eau biomol stérile, 5 μL de tampon PCR (Eurobio), 1.5 μL de solution de MgCl_2 (Eurobio) (Concentration finale= $C_f=1.5$ mM), 3 μL de solution de dNTPs ($C_f=120$ μM chacun), 4 μL de solution de chaque amorce ($C_f=1$ μM), 2.5 μL de solution de sérum albumine bovin (BSA) ($C_f=5$ mg/mL) et 0.25 μL de solution de taq DNA polymérase (eurobluetaq, Eurobio) ($C_f=1.25$ U)

Les amorces bactériennes universelles (ADN 16S) suivantes ont été utilisées : la P78 (GCG CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCC G CCT ACG GGA GGC AGC AG) (Muyzer et *al.* 1993) et la P79 (CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT) (Schauer et *al.* 2000). On peut noter la présence d'un clamp GC à l'extrémité 5' de l'amorce P78, qui sert à conserver les deux brins d'ADN attachés lors de la migration en électrophorèse sur gel en gradient dénaturant ou DGGE. La longueur du fragment ainsi amplifié est de 550 pb.

Le thermocycleur a été programmé comme détaillé dans le tableau 2.

Tableau 2. Paramètres du thermocycleur lors de l'amplification

	Première boucle	Deuxième boucle	Troisième boucle	Quatrième boucle
Nombre de cycles	1	10	20	1
Dénaturation	5 min à 94°C	1 min à 94°C	1 min à 94°C	1 min à 72°C
Hybridation		1 min à 65°C (-1°C/cycle)	1min à 55°C	
Elongation		3 min à 72°C	3min à 72°C	

- Vérification et purification de l'ADN amplifié

5 µL de produits PCR ont été déposés sur gel d'agarose 1,4% afin de vérifier la taille du fragment amplifié, son unicité et sa pureté. Lorsque cela s'est avéré nécessaire, une purification sur colonne Qiagen a été réalisée.

- DGGE

L'électrophorèse en gradient de gel dénaturant (DGGE en anglais) a été utilisée pour examiner les réponses, en terme de composition, des bactéries à nos différents enrichissements en nutriments. Brièvement, la DGGE est une technique de biologie moléculaire permettant de faire migrer de façon différentielle des fragments d'ADN de même taille en fonction de leurs séquences. Ainsi, en appliquant cette technique sur l'ADNr 16S bactérien, il est possible de discriminer les différents groupes qui apparaissent sous forme de bandes. Le séquençage des bandes permet d'analyser la composition des communautés bactériennes.

Deux solutions stocks à 6% d'acrylamide, l'une à 0% d'urée/formamide et l'autre à 80% d'urée/formamide ont été préparées (100 mL de solution à 80% nécessitent 33.6g d'urée et 32 mL de formamide déionisé ; 100 % de dénaturant correspondant à 7M d'urée et 40% de formamide). A partir de ces solutions, différents gradients de dénaturation (40%-80%, 40%-75%, 40%-60%, 50%-65%) ont été réalisés afin d'optimiser la migration sur le gel. En plus de ce gradient en agents dénaturants, les gels étaient constitués d'une partie supérieure à 0% d'urée/formamide pour débiter la migration et concentrer l'ADN. Les agents de polymérisation utilisés étaient le TEMED et l'APS qui permettent une polymérisation des gels en 3 heures.

25 µL de produits PCR ont été déposés dans les puits avec 10 µL de bleu de migration GBL5X. Les migrations ont été réalisées à une température de 60°C pendant 16h à 100V dans un bain-marie.

La révélation a été faite au SYBR GOLD (fluorochrome se fixant sur l'ADN) pendant 45 min à l'obscurité et des photographies ont été prises sous UV.

La comparaison des abondances bactériennes dans les différents traitements a été faite à l'aide du test de Kruskal-Wallis, en utilisant le logiciel JMP version 5.0.1.

RESULTATS

1. Effets des différents nutriments sur les abondances bactériennes

- Expériences 1 et 2

Les variations des abondances totales des bactéries et des proportions des bactéries à contenu en acides nucléiques élevé (HNA) lors des expériences 1 et 2 sont présentées dans les figures 3 et 4. Il apparaît que tous les enrichissements conduisent à des abondances totales et des proportions de bactéries HNA significativement plus élevées ($p < 0.05$) que dans le contrôle à partir de T48 et que la croissance bactérienne est très faible dans tous les traitements entre T0 et T24. On note aussi que le plateau semble souvent atteint plus rapidement (T48 ou T72) dans le traitement avec la plus forte concentration de phosphore ajouté (60 µM) que dans le traitement à 1 µM de phosphore, où les abondances semblent encore en augmentation (figures 3A et 4A). Les variations de concentration de phosphore ne montrent pas un effet clair sur les abondances des bactéries : En effet, alors que l'ordre des abondances dans les traitements est 60 µM > 8 µM > 1 µM à T48 (phase de croissance) dans l'expérience 1, l'abondance dans le traitement à 1 µM devient supérieur à celle des deux autres à T72. Dans l'expérience 2, l'ordre des abondances est plutôt 1 µM > 60 > 8 µM. L'absence d'effet significatif des variations des concentrations de phosphore sur les proportions de bactéries HNA est également notée (figures 3B et 4B).

La combinaison d'azote et de phosphore à 1 µM donne des abondances totales et des proportions de bactéries HNA généralement similaires ou légèrement supérieures à celles obtenues dans le contrôle à 1 µM de phosphate. Par ailleurs, les différentes formes d'azote ne donnent pas des abondances et des proportions de bactéries HNA significativement différentes d'un traitement à l'autre ($p > 0.05$, figure

3A et 4A). Les proportions de bactéries HNA partent d'environ 30-35% à T0 pour se stabiliser à environ 85-90% dans les traitements enrichis ou atteindre 70% dans le contrôle à la fin de l'expérience 1, alors que dans l'expérience 2, elles partent des valeurs plus élevées à T0 (55 à 70%) pour, à la fin, se stabiliser à environ 90% dans les traitements enrichis ou atteindre 65% dans le contrôle où le pic (~80%) est atteint à T24 (figures 3B et 4B). Il faut noter que dans tous les traitements sans addition de nutriment, l'abondance totale des bactéries est faible et varie très peu dans le temps (figure 3A et 4A).

- Expériences 3 et 4

Il convient de rappeler que les expériences 3 et 4 diffèrent des expériences 1 et 2 par le fait qu'elles n'ont pas reçu de phosphore dans les réplicats enrichis en azote.

Comme lors des expériences 1 et 2, la croissance des bactéries entre T0 et T24 lors des expériences 3 et 4 est très faible dans tous les traitements et l'abondance totale des bactéries augmente assez faiblement dans les contrôles du début à la fin des expériences (figures 5A et 6A).

A partir de T48, des différences significatives apparaissent entre les traitements. Les traitements avec phosphore ont des abondances significativement plus élevées que les contrôles et les traitements avec azote, et, on note que les concentrations plus élevées de phosphore (60 μM ou 8 μM) donnent en générale des abondances totales plus élevées que la concentration de 1 μM de phosphore.

Les traitements à l'azote augmentent généralement significativement l'abondance totale des bactéries à T48 (c'est-à-dire en phase de croissance) mais pas à T72 qui correspond souvent à la phase de plateau. Cependant cet effet des sources azotées semble différent de l'expérience 3 à l'expérience 4. Dans l'expérience 3, les ordres d'abondance à T48 sont : nitrate > ammonium > urée alors que pour l'expérience 4, ils sont : urée > nitrate > ammonium.

Tout comme les abondances totales, les proportions des bactéries HNA sont significativement plus élevées dans les traitements avec phosphore que dans le contrôle et les traitements avec azote, à partir de T48. En dehors d'un cas (addition de nitrate), les proportions de bactéries HNA dans les traitements à l'azote sont similaires et pas significativement différentes de celle obtenues dans le contrôle (figure 5B et 6B). Les proportions de bactéries HNA en phase de plateau (T48 à T72)

sont d'environ 90% dans les traitements à phosphore et inférieures ou égales à 80% dans les autres traitements.

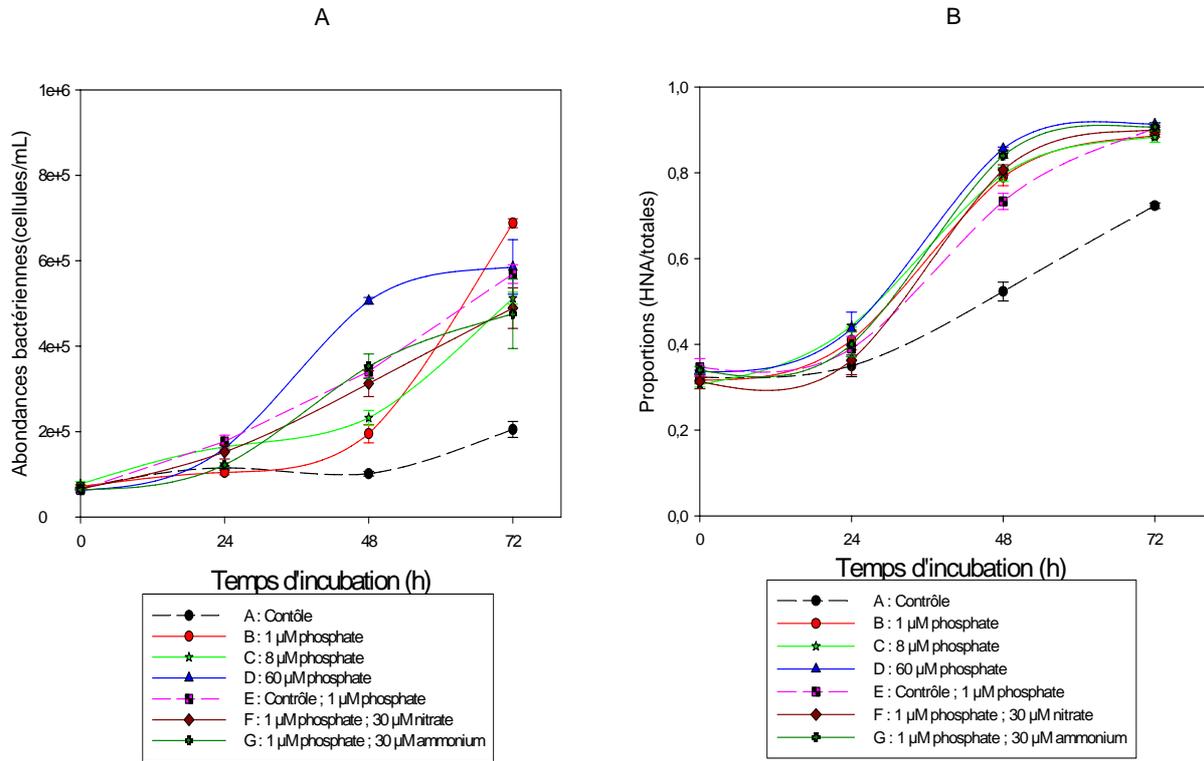


Figure 3. Réponses de l'abondance totale des bactéries (A) et de la proportion des bactéries au contenu en acides nucléiques élevé (HNA) (B) aux enrichissements en éléments nutritifs au cours de l'expérience 1.

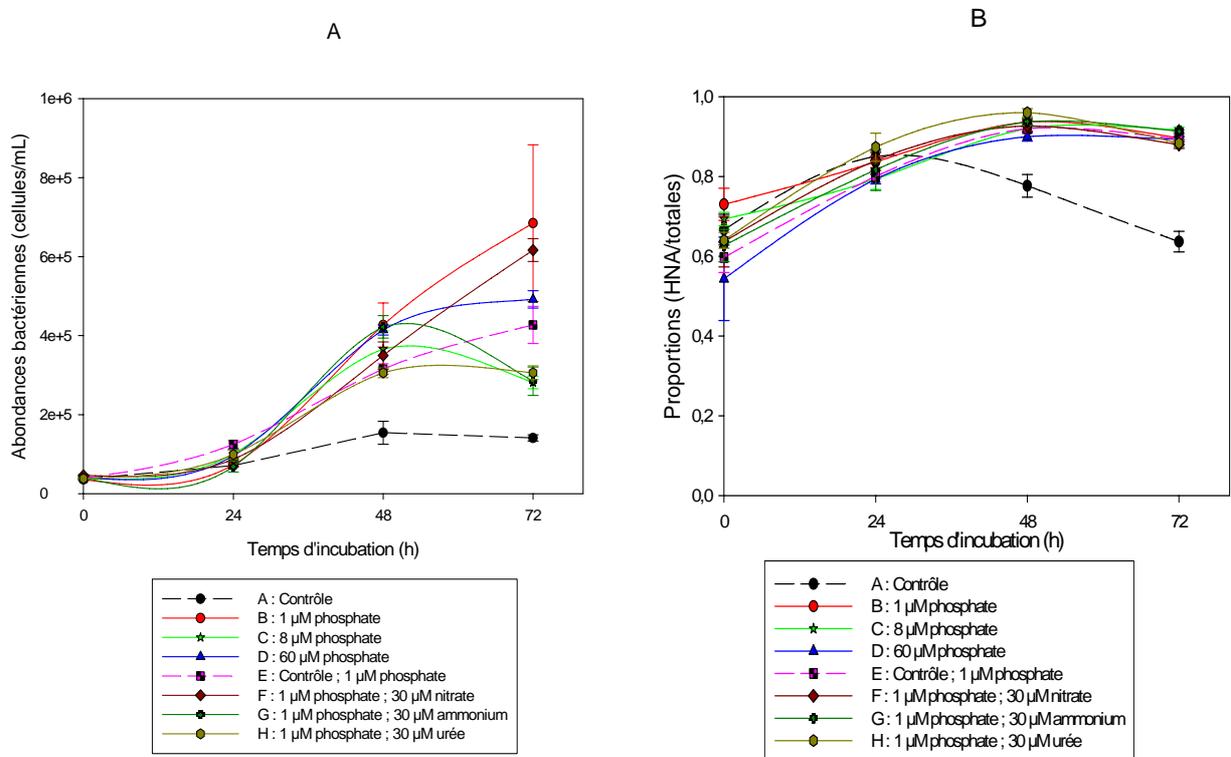


Figure 4. Réponses de l'abondance totale des bactéries (A) et de la proportion des bactéries au contenu en acides nucléiques élevé (HNA) (B) aux enrichissements en éléments nutritifs au cours de l'expérience 2.

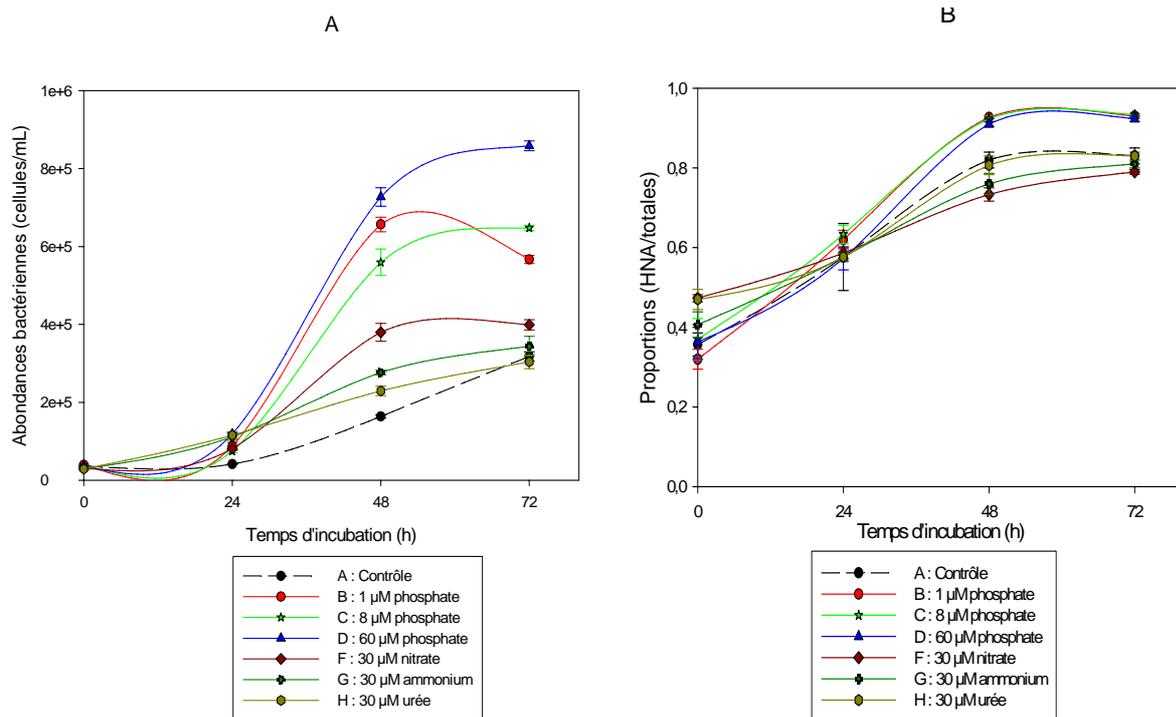


Figure 5. Réponses de l'abondance totale des bactéries (A) et de la proportion des bactéries au contenu en acides nucléiques élevé (HNA) (B) aux enrichissements en éléments nutritifs au cours de l'expérience 3.

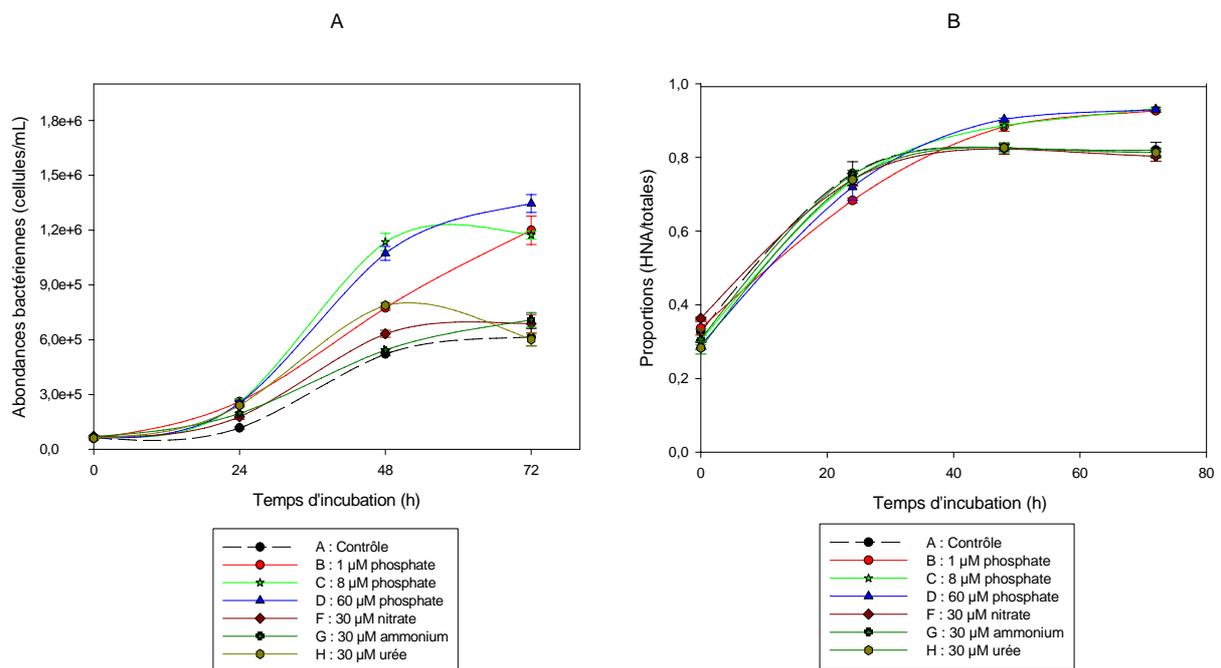


Figure 6. Réponses de l'abondance totale des bactéries (A) et de la proportion des bactéries au contenu en acides nucléiques élevé (HNA) (B) aux enrichissements en éléments nutritifs au cours de l'expérience 4.

2. Effets des différents nutriments sur la composition bactérienne

Les difficultés techniques rencontrées au cours des analyses de biologie moléculaire n'ont permis d'obtenir qu'un seul gel de DGGE avant la rédaction de ce rapport. La figure 7 présente ce gel, obtenu pour l'expérience 2 et représente les différentes bandes révélées pour les différents traitements.

Certains échantillons (y compris le contrôle = A sur la figure) ne présentent pas de bandes visibles. De plus, les produits PCR obtenus à partir de l'extraction d'ADN issue de l'inoculum ne donnent pas non plus de bandes apparentes sur le gel. Il est donc difficile de dire quel était l'effet de l'apport de phosphore sur la composition bactérienne, et de mettre en évidence l'effet du confinement sur les communautés.

Néanmoins, ce gel peut permettre de comparer les traitements avec phosphore seul aux traitements ayant reçu de l'azote en plus, ainsi que les traitements avec les différentes sources d'azote entre eux. Environ 18 bandes sont assez visibles sur l'ensemble du gel. Il apparaît que la bande 9 qui est visible dans tous les traitements dont le gel est bien contrasté, est inexistante dans le traitement B ($P = 1 \mu\text{M}$). Les bandes 4 et 5, assez distinctes dans les traitements H (+ urée), semblent ne pas apparaître dans les autres traitements, où au même niveau, il semble avoir une bande épaisse (bande 6). Enfin la bande 15 assez visible dans les traitements avec phosphore n'apparaît quasiment pas dans les traitements ayant reçu l'azote en plus.

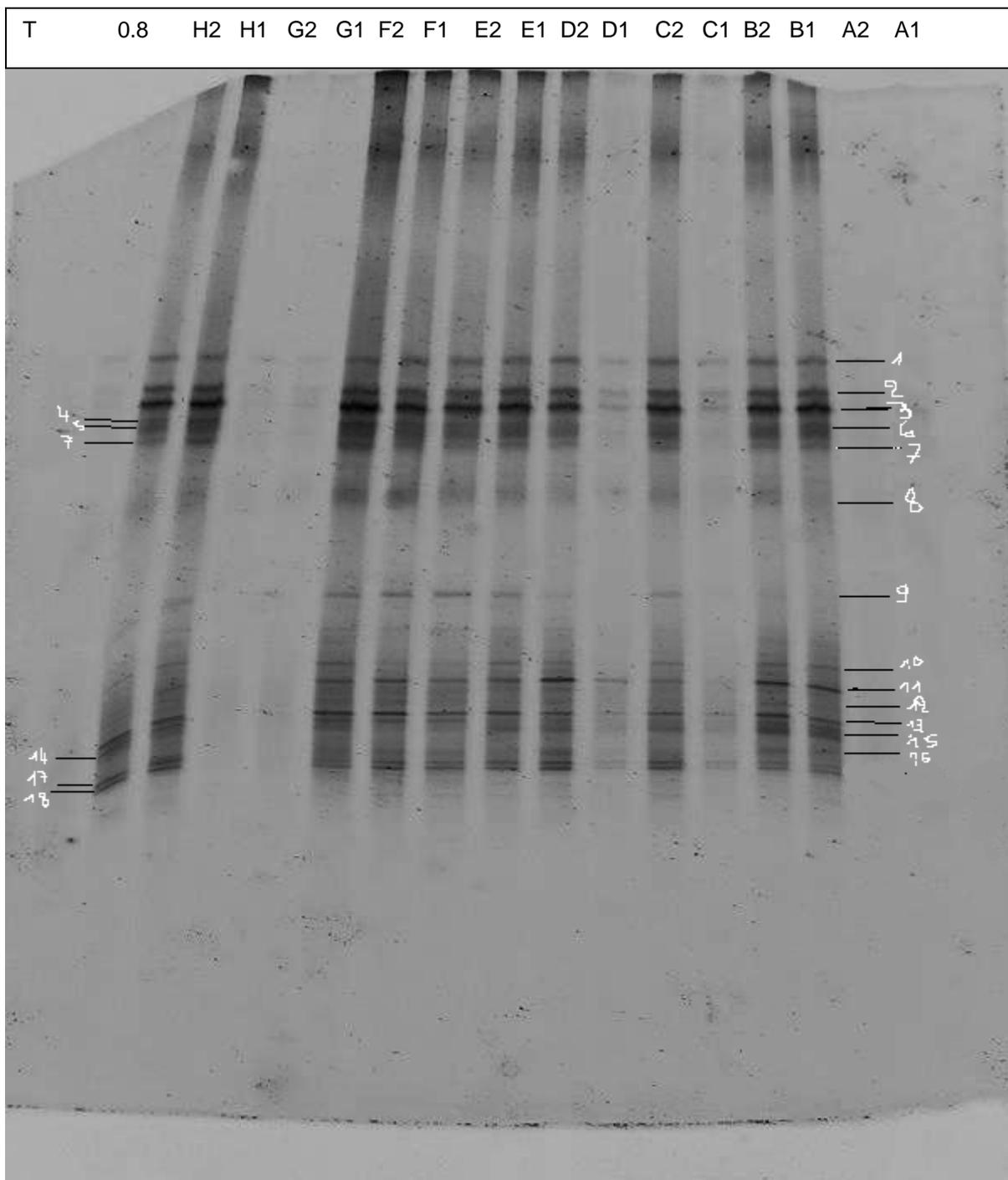


Figure 7. DGGE (épaisseur 1mm ; gradient 40-75%) des ADNr 16S amplifiés par PCR pour les 8 traitements, en duplicat, de l'expérience 2. Les chiffres 1 et 2 indiquent les duplicats (réplicats 1 et 2) du même traitement.

- A : Contrôle
- B : 1 μ M phosphate
- C : 8 μ M phosphate
- D : 60 μ M phosphate
- E : Contrôle; 1 μ M phosphate
- F : 30 μ M nitrate ; 1 μ M phosphate
- G : 30 μ M ammonium ; 1 μ M phosphate
- H : 30 μ M urée ; 1 μ M phosphate
- T : Témoin de PCR
- 0.8 : Profil correspondant à l'inoculum

DISCUSSION

1. Effets des nutriments sur les abondances bactériennes

Les résultats des quatre expériences réalisées à différents moments de l'année, démontrent tous que l'addition du phosphore entraîne une augmentation significative de l'abondance bactérienne en comparaison avec le contrôle, alors que l'ajout d'une source azotée donne des résultats, dans la majorité des cas, similaires aux contrôles et aux traitements ayant reçu l'azote et le phosphore. Ces résultats démontrent que le phosphore est un élément majeur, limitant la croissance bactérienne dans le lac d'Annecy, et confirment les résultats rapportés dans d'autres lacs (ex : Toolan et *al.* 1991 ; Carlson et Caron 2001).

Les proportions de bactéries HNA augmentent dans tous les traitements, y compris le contrôle (A), durant les incubations, confirmant que le seul fait de confiner les bactéries libres entraîne une augmentation de la proportion de bactéries ayant un contenu en acides nucléiques élevé (Gasol et *al.* 1999) traduisant un accroissement de l'activité bactérienne.

Contrairement aux expériences 1 et 2, où le phosphore a été ajouté dans tous les traitements et où les proportions de bactéries HNA sont similaires, les expériences 3 et 4 (sans phosphore dans les traitements enrichis en azote) révèlent des proportions de bactéries HNA significativement plus élevées dans les traitements à phosphore, indiquant que l'élément limitant, ici le phosphore, déterminerait à la fois le seuil de la phase stationnaire et la proportion de bactéries HNA atteinte.

Les études comparatives montrent que les abondances totales des bactéries, ainsi que les proportions des bactéries HNA sont généralement plus élevées dans les milieux eutrophes (c'est à dire riche en nutriments) que dans les milieux oligotrophes. De plus, une étude comparative basée sur la méthode de dilution montre que les valeurs les plus élevées d'abondance bactérienne, pendant la phase stationnaire, étaient souvent rencontrées dans les lacs où les concentrations de phosphore étaient les plus élevées (Smith et Prairie 2004). Nous nous attendions de ce fait à ce que les abondances totales et les proportions de bactéries HNA soient significativement croissantes sur le gradient +1 μM , +8 μM , +60 μM de phosphore. Cela était perceptible uniquement pour les abondances et seulement pour les expériences 3 et 4 (figures 5A et 6A). Dans les deux autres expériences, même si les

abondances dans les traitements +60 μM sont supérieures à celles dans les traitements +8 μM , celles obtenues dans les traitements +1 μM sont plus élevées à T72 (figure 3A et 4A). Il semble alors que l'augmentation des concentrations de phosphore entraîne une augmentation de l'abondance bactérienne, mais que les réponses soient plus variables à plus faibles concentrations du nutriment. Le fait que ces abondances soient plus élevées dans le traitement +1 μM dans les expériences 1 et 2 semble difficile à expliquer. Cependant, on pourrait penser qu'il soit en partie dû à une légère modification de la composition bactérienne comme le suggère l'absence de la bande 9 dans le traitement +1 μM (B dans la figure 7) comparé aux autres traitements. Cette variabilité de la réponse, aussi notée pour les sources d'azote dans les expériences 3 et 4, pourrait aussi être le reflet des différences au niveau des communautés bactériennes de départ, étant donné que nos échantillons ont été pris à différents moments de l'année.

Contrairement aux abondances totales, les proportions de bactéries HNA ne semblaient pas affectées par les augmentations des concentrations de phosphore au cours de cette étude. Cependant l'analyse non encore achevée des caractéristiques cellulaires des bactéries (FL1, SSC) en cytométrie suggère l'existence de différences entre les bactéries HNA obtenues dans les différents traitements (Figure 8) ce qui voudrait dire qu'une absence de différence au niveau des abondances des proportions n'équivaut pas à dire que les bactéries ont la même activité.

Les proportions de bactéries HNA juste avant nos incubations sont variables d'une expérience à l'autre, en accord avec les travaux de Nishimura et *al.* (2005) montrant une variation de ces proportions avec la saison. Même si les caractéristiques cytométriques de la majorité des bactéries changent pendant l'incubation dans le sens de l'augmentation de la fluorescence (FL1), les proportions de HNA n'atteignent jamais les 100% même dans les traitements enrichis (figure 3B, 4B, 5B, 6B). Il est donc à se poser la question de savoir si les autres bactéries (LNA) observées à T72 (figure 8) représentent des groupes spécifiques dont la croissance est plus faible ou alors des bactéries en phase de sénescence ou de réduction d'activité, qui sont déjà passées par un stade à contenu en acides nucléiques élevé. Cela reste un sujet à controverse et mérite davantage de travaux. Certaines études ont montré que les bactéries HNA et les bactéries LNA avaient des compositions phylogénétiques différentes (Zubkov et *al.* 2002) alors que d'autres études ont

retrouvé certains groupes ou espèces dans ces deux groupes cytométriques (Servais *et al.* 2003).

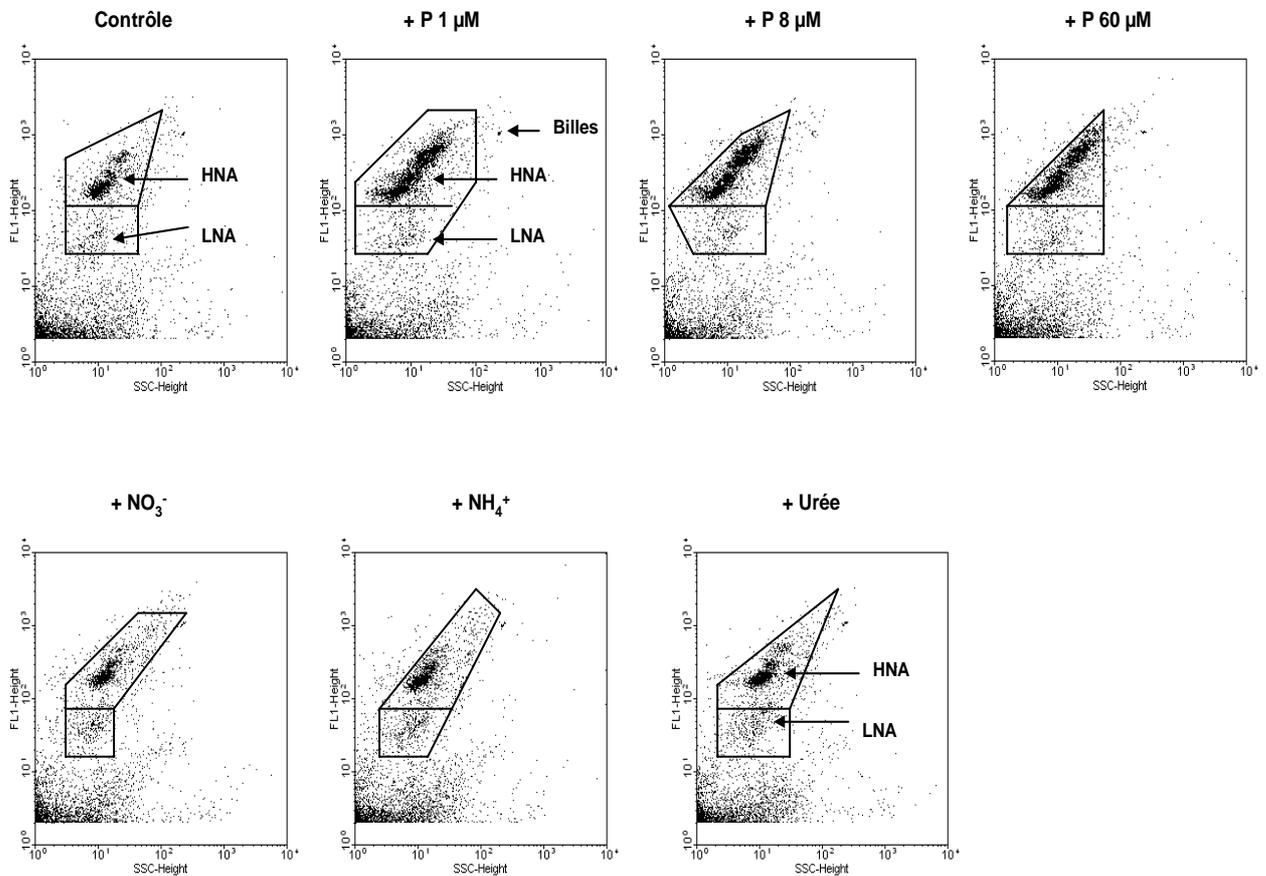


Figure 8. Cytogrammes représentatifs des groupes bactériens au contenu en acides nucléiques élevé (HNA) et faible (LNA) obtenu pour l'analyse des échantillons de l'expérience 3 à T72.

2. Effets des nutriments sur la composition bactérienne

L'absence de bandes pour certains échantillons sur le gel représenté sur la figure 7 est probablement en partie due à une mauvaise amplification PCR pour ces échantillons.

Le signal d'amplification pour ces échantillons était très faible sur le gel de vérification à 1.4% d'agarose. Cette mauvaise amplification pourrait être due, pour les traitements avec enrichissements, à des problèmes méthodologiques liés à l'extraction au phénol chloroforme, et pour le contrôle à de faibles concentrations

d'ADN de départ (observations faites sur le gel d'agarose 0.5%) dues à la faible croissance des bactéries et donc des faibles abondances obtenues à T72 (figures 3, 4, 5 et 6).

En dépit de ces difficultés méthodologiques, le gel obtenu pour l'expérience 2 (figure 7) suggère des modifications de la composition des bactéries en relation avec les différents traitements. Bien que les sources d'azote n'aient pas eu d'effet significatif sur les abondances bactériennes, les traitements à azote présentent des bandes qui ne se retrouvent pas dans les autres traitements : il s'agit des bandes 4 et 5 dans le traitement à l'urée (H) et de la bande 14 qui apparaît dans le traitement à l'urée (H) et dans le traitement aux nitrates (F). Les bandes 4, 5 et 14 pourraient donc être des groupes de bactéries impliqués dans le cycle de l'azote, et capables d'utiliser un composé organique tel que l'urée.

Alors que l'effet des concentrations en phosphore sur la composition des bactéries est difficile à évaluer sur l'unique gel obtenu, il apparaît que certaines bactéries pourraient se développer en présence de phosphore seul mais pas en combinaison avec l'azote. Cela pourrait être le cas des bactéries de la bande 15. Il est possible que ces bactéries subissent un effet négatif de l'azote ou alors se développent surtout en présence de certains rapports N/P, qui selon nos enrichissements devraient être différents dans les différents traitements.

L'observation d'un seul gel limite nos interprétations et toute tentative de généralisation, nous obligeant à rester dans le domaine de la spéculation. Toutefois, l'analyse de l'ensemble des expériences et le séquençage des bandes nous donnerons probablement de meilleures informations.

CONCLUSION

Il est toujours délicat, voire difficile de transposer les résultats obtenus de microcosmes au milieu naturel. De plus, la filtration sur 0,8 μm élimine, sans doute, les bactéries de grandes tailles et les bactéries attachées qui ne sont pas prises en compte dans nos résultats. Cependant les microcosmes permettent d'examiner les mécanismes qui régissent les processus ou les faits observés en milieu naturel. L'utilisation de microcosmes dans cette étude pour évaluer l'effet des types et des concentrations de nutriments sur les bactéries d'eaux douces nous a permis non seulement de confirmer des résultats trouvés auparavant, mais aussi d'obtenir

expérimentalement des résultats qui sont souvent admis mais très rarement démontrés. Il apparaît que l'augmentation de concentration de phosphore tend à augmenter les abondances des bactéries et pourrait être un élément majeur aidant à expliquer pourquoi les abondances bactériennes sont plus importantes dans les lacs eutrophes que dans les lacs oligotrophes. L'élément limitant, ici le phosphore, pourrait être le facteur majeur déterminant la proportion de bactéries actives dans les écosystèmes d'eaux douces. Enfin, il apparaît que le phosphore d'une part et l'azote d'autre part pourraient générer, au niveau de la composition bactérienne, des modifications légèrement différentes basées sur quelques groupes alors que l'ensemble des communautés reste semblable pour les deux types de nutriments. Cela reste à confirmer par l'analyse plus fine de la composition bactérienne, prévue à l'aide du séquençage.

Références bibliographiques

- 1) Ammerman JW, Fuhrman JA, Hagstroem A and Azam F. Bacterioplankton growth in seawater: I. Growth kinetics and cellular characteristics in seawater cultures. *Marine Ecology Progress Series*. 1984;18:31-39.
- 2) Carlson P et Caron DA. Seasonal variation of phosphorus limitation of bacterial growth in a small lake. *Limnol. Oceanogr.* 2001;46:108-120.
- 3) Coverney MF et Wetzel RG. Effects of Nutrients on Specific Growth Rate of Bacterioplankton in Oligotrophic Lake Water Cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992;58:150-156.
- 4) Fisher MM, Klug JL, Lacuster G, Newton M et Triplett EW. Effects of resources and trophic interactions on freshwater bacterialplankton diversity. *Microb. Ecol.* 2000;40:125-138.
- 5) Gasol JM, Zweifel UL, Peters F, Fuhrman JA et Hagstrom A. Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as measured by flow cytometry in natural planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999;65:4475-4483.
- 6) Lebaron P, Parthuisot N, Nand et Catala P. Comparison of blue nucleic acid dyes for flow cytometric enumeration of bacteria in aquatic systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998;64:1725-1730.
- 7) Lebaron P, Servais P, Agogué H, Courties C et Joux F. Does the high nucleic acid content of individual bacterial cells allow us to discriminate between active cells and inactive cells in aquatic systems? *Appl. Environ. Microbiol.* 2001;67:1775-1782.
- 8) Li WKW, Jellett JF et Dickie PM. DNA distribution in planktonic bacteria stained with TOTO or TO-PRO. *Limnol. Oceanogr.* 1995;40:1485-1495.

- 9) Massana R, Murray AE, Preston CE et DeLong EF. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997;63:50-56.

- 10) Muyzer G, De Waal EC et Uitterlinden AC. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993;59:695-700.

- 11) Nishimura Y, Kim C et Nagata T. Vertical and seasonal variations of bacterioplankton subgroups with different nucleic acid contents: Possible regulation by phosphorus. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005;71:5828-5836.

- 12) OCDE. Organisation de coopération et de développement économiques : Eutrophisation des eaux ; méthodes de surveillance, d'évaluation et de lutte. 1982.

- 13) Schäfer H, Bernard L, Courties C, Lebaron P et *al.* Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. *FEMS Microbiology Ecology.* 2001;34:243-253.

- 14) Schauer M, R Massana R et Pedros-Alio C. Spatial differences in bacterioplankton composition along the catalan coast (NW Mediteranean) assessed by molecular fingerprinting. *FEMS Microbiology Ecology.* 2000;33:51-59.

- 15) Servais P, Casamayor EO, Courties C, Catala P, Parthuisot N et Lebaron P. Activity and diversity of bacterial cells with high and low nucleic acid content. *Aquat. Microb. Ecol.* 2003;33:41-51.

- 16) SILA. Vingt-cinq années au service du lac d'Annecy 1957-1982 ; Syndicat Intercommunal des communes Riveraines du Lac d'Annecy.

- 17) Smith EM et Prairie YT. Bacterial metabolism and growth efficiency in lakes: The importance of phosphorus availability. *Limnol. Oceanogr.* 2004;49:137-147
- 18) Tadonl  k   RD, Planas D et Lucotte M. Microbial food webs in boreal humic lakes and reservoirs : ciliates as a major factor related to the dynamics of the most active bacteria. *Microbial Ecology.* 2005;49:325-341.
- 19) Toolan T, Wehr JD et Findlay S. Inorganic phosphorus stimulation of bacterioplankton production in a meso-eutrophic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991;57:2074-2078.
- 20) Viboud S et Fontvieille D. Contrat Plan Etat Region : Contribution de la boucle microbienne au fonctionnement des chaînes trophiques du lac d'Annecy. 1999.20-24.
- 21) Zubkov MV, Fuchs BM, Tarran GA, Burkill PH et Amann R. Mesoscale distribution of dominant bacterioplankton groups in the northern North Sea in early summer. *Aquat. Microb. Ecol.* 2002;29:135-144.
- 22) Site internet : http://www.environnement.gouv.fr/rhone-alpes/lacs_rha/lacs_annecy.htm

Résumé

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet direct de différents éléments nutritifs inorganiques (phosphate, nitrate, ammonium) et organiques (urée), ainsi que de l'augmentation des concentrations en phosphore sur l'abondance et la proportion des bactéries au contenu en acides nucléiques élevé (HNA) et sur la diversité phylogénétique bactérienne. Nous avons utilisé la technique de dilution avec et sans enrichissement suivie d'incubation de 72h à 20°C.

La détermination des abondances bactériennes en cytométrie en flux a révélé une augmentation des proportions de bactéries HNA dans les enrichissements en phosphore par rapport au contrôle. L'effet des concentrations en phosphore était net dans certaines expériences mais pas dans d'autres. Par contre, les enrichissements en azote n'engendraient pas de variations significatives par rapport au contrôle.

Bien que l'effet des concentrations de phosphore sur la composition bactérienne ait été difficile à évaluer, il apparaît que certaines bandes présentes dans le traitement à concentration élevée n'existaient pas dans ceux à faible concentration de phosphore. Les différents types de sources d'azote semblent donner des compositions bactériennes légèrement différentes entre les traitements, et comparés aux traitements au phosphore.

Mots clés : Bactérioplancton, dilution, éléments nutritifs, microcosmes, cytométrie en flux, DGGE.

INRA Thonon Les Bains
75 Avenue de Corzent
74200 Thonon Les Bains

Directeur de l'unité: Jean Marcel Dorioz
Equipe d'accueil : Ecologie Microbienne Aquatique
Animatrice : Agnès Bouchez
Responsable de stage : Rémy Tadonlélé
Stagiaire : Nicolas Akin