



**HAL**  
open science

# L'écosystème a-t-il une mémoire? Importance de l'histoire sur la résilience fonctionnelle de communautés bactériennes hétérotrophes marines et anaérobies

Olivier Zemb

## ► To cite this version:

Olivier Zemb. L'écosystème a-t-il une mémoire? Importance de l'histoire sur la résilience fonctionnelle de communautés bactériennes hétérotrophes marines et anaérobies. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Claude Bernard Lyon 1, 2007. Français. NNT: . tel-02824480

**HAL Id: tel-02824480**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02824480>**

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.

THESE

présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

présentée et soutenue publiquement le 26 avril 2007

par

M Olivier ZEMB

TITRE :

**L'écosystème a-t-il une mémoire ?  
Importance de l'histoire sur la résilience fonctionnelle de communautés  
bactériennes hétérotrophes marines et anaérobies**

Directeurs de thèse :

Philippe LEBARON  
Jean-Jacques GODON

JURY :

Mme. Maria Fernandez, Présidente  
Mme. Purificación López-García, Rapporteur  
M. Xavier Le Roux, Rapporteur  
M.Philippe Lebaron, Directeur de thèse  
M.Jean-Jacques Godon, Directeur de thèse

*La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne.*

*La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi.*

**Albert EINSTEIN**

## Remerciements :

Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire de Biotechnologie de l'environnement (LBE) et du Laboratoire d'Océanographie de Banyuls/mer (LOB) dans le cadre d'un projet ACI portant sur la résilience. Je tiens à remercier Jean-Philippe Delgènes et Philippe Lebaron pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire respectif et d'avoir approuvé la répartition du travail entre les deux laboratoires.

Je remercie très chaleureusement Philippe Lebaron pour avoir dirigé ma thèse en me laissant une grande liberté tout en empêchant la dispersion, et d'avoir été compréhensif dans les moments difficiles.

Je remercie infiniment Jean-jacques Godon pour les nombreuses heures que nous avons passées à discuter de la thèse et de toutes sortes de sujets qui y étaient plus ou moins étroitement liés : Son soutien, sa gentillesse et le pragmatisme avec lequel il envisage la faisabilité et les conclusions potentielles des expériences m'ont été précieux.

Je remercie mon jury, Purification Lopez-Garcia, Maria Fernandez et Xavier Le Roux pour avoir accepté de consacrer du temps à lire ma thèse.

Je dois remercier Muriel Bourrain pour avoir permis le financement et la construction des chemostats marins continus à Banyuls/mer. Je souhaite également remercier Philippe Sousbie et Michel Torrijos, qui ont rendu possible la construction et le fonctionnement de réacteurs anaérobies de laboratoire à Narbonne.

Cependant, le matériel biologique nécessitant une attention constante, je veux également adresser mes sincères remerciements toutes les personnes qui ont participé à un moment où à un autre à la surveillance et/ou maintenance des chemostats. Leur présence m'a permis de gérer une activité parallèle et parfois simultanée à Banyuls et à Narbonne.

Pour les chemostats marins, je remercie chaleureusement Laurent Uríos, Laurent Intertaglia, Raphaël Lami, Antoine Carlier, Eliane Rubio et Karine Escoubeyrou.

Pour les bioréacteurs anaérobies, je tiens à remercier Léa Molinie, dont l'encadrement a été une expérience très agréable, mais aussi Julie Juminez, Djalel Mazouni, Sen Biswarup, Jérôme Hamelin, Maxime Dumont, Romain Cresson, Jeremy Guendouz, Alice Rochex, Marina Moletta, Valérie Bru, Patrick Dabert et Pierre Buffière.

Je remercie mon entourage Banyulenc, c'est-à-dire Marielle, Annabelle, Laurent I., Audrey, Cécile, Nathalie, Faustine, Ingrid, Carmen, Sabine, Arturo, et toute l'équipe de microbiologie pour l'ambiance de travail parsemée de moments de détente en regardant la baie de Banyuls depuis la terrasse. La qualité de la cuisine orchestrée par Christophe a également participé à la douceur de vivre banyulenne.

Je remercie tout particulièrement Jennifer, Nyree, Raphael et Laurent U. pour leur relecture constructive des articles et de la thèse ainsi qu' Annabelle, Raphaël et Antoine Aze pour leur compagnie et leur hébergement en cas de besoin tout au long de la thèse.

L'environnement narbonnais fut tout aussi agréable grâce à Patrick, Nathalie, Jerome, Bart, Dimitri, Véro et l'ensemble du laboratoire. J'ai pu profiter pleinement de cet environnement grâce à l'hébergement de Jérôme, Antoine B., Maxime, Coralie, Mathieu et Djalel : Merci à vous tous et pardon de vous avoir fait parfois veiller tard.

Je souhaite remercier très chaudement Bart et Djalel pour leur aide et leur cours personnalisé de Matlab. Je souhaite également adresser mes plus vifs remerciements à Jérôme pour son soutien permanent et sa bonne humeur ponctuée de contrepétories, Mathieu pour ses explications extrêmement claires à propos de sa technique d'empreinte auprès de laquelle la SSCP est d'une simplicité triviale, et Bart pour les longues discussions à propos d'équations différentielles mais aussi des raisons physiques de la couleur du ciel.

En ce qui me concerne, le ciel a été bleu pendant trois ans en partie grâce à ma famille qui m'a toujours soutenu : Merci à mon père d'avoir lu l'ébauche de ma thèse, à ma mère qui m'a souvent aidé dans les méandres administratifs, à mon frère que sa position délicate d'ingénieur informaticien a placé en première ligne en cas de problème plus ou moins étroitement lié à l'ordinateur, et à ma petite sœur qui m'a souvent détendu avec ses cours de « prépa bio ». Enfin, ces trois ans n'auraient pas été les mêmes sans Caro, ma petite compagne «de facto spouse » qui chasse tous les nuages.

## Table des matières

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>8</b>
<b>CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>19</b>
<b><i>I.1. LE CONCEPT DE RÉSILIENCE FONCTIONNELLE ET SON APPLICATION SUR DES SYSTÈMES DE MACRO-ORGANISMES .....</i></b>	<b>20</b>
<b><i>I.1.1. CONCEPT DE STABILITÉ, ÉTAT D'ÉQUILIBRE, RÉSISTANCE ET RÉSILIENCE .....</i></b>	<b>20</b>
1.1.1.1. Définition physique d'un équilibre stable en tant que résilience malgré un choc .....	20
a) Pour une variable à une dimension .....	20
b) Pour un système à multiples dimensions .....	22
c) Définir une échelle d'observation d'espace et de temps pour des systèmes biologiques.....	22
1.1.1.2. Choc persistant et non persistant. ....	23
1.1.1.3. La résilience écologique, aptitude du système à retourner vers le même équilibre .....	24
(a) Choc maximal que le système peut supporter .....	24
(b) Variation maximale que le système peut supporter.....	25
(c) Remarque sur la taille du bassin d'attraction.....	25
1.1.1.4. La résilience d'ingénierie, cinétique d'un système revenant au même équilibre.....	26
(a) Temps de retour à la valeur de consigne .....	26
(b) Vitesse de retour à la valeur de consigne .....	26
(c) Indice d'Orwin pour quantifier la résilience .....	27
(d) La cinétique de retour à l'équilibre.....	28
(e) Remarque sur la résistance .....	29
1.1.1.5. Stratège « r », stratège « K » et principe de résilience maximum.....	29
<b><i>I.1.2. LES FACTEURS FAVORISANT UNE RÉSILIENCE FONCTIONNELLE FORTE CHEZ LES MACRO-ORGANISMES.....</i></b>	<b>30</b>
1.1.2.1. Les communautés fortement résilientes peuvent réagir par un changement physiologique.....	30
1.1.2.2. Les communautés fortement résilientes peuvent réagir par un changement de structure.....	31
a) La diversité en tant que richesse spécifique.....	31
b) Les communautés aux organismes diversifiés .....	31
c) Une plus grande richesse spécifique favorise une forte redondance fonctionnelle .....	32
d) Une forte redondance fonctionnelle des organismes favorise une forte résilience.....	34
e) L'organisation en chaîne trophique.....	36
f) Le contrôle par prédation ou par disponibilité de nutriments .....	38
g) L'hypothèse des perturbations intermédiaires .....	38
1.1.2.3. Les facteurs favorisant un retour rapide après un choc quelle que soit la communauté.....	39
a) Importance du flux d'énergie et de nutriments.....	39
b) Environnement hétérogène .....	39
<b><i>I.1.3. CONCLUSION SUR LES THÉORIES SE RAPPORTANT À LA RÉSILIENCE FONCTIONNELLE ET SUR LES OBSERVATIONS DE MACRO-SYSTÈMES .....</i></b>	<b>39</b>
<b><i>I.2. LA RÉSILIENCE FONCTIONNELLE DES ÉCOSYSTÈMES MICROBIENS .....</i></b>	<b>40</b>
<b><i>I.2.1. LES PARTICULARITÉS DES ÉCOSYSTÈMES MICROBIENS .....</i></b>	<b>40</b>
1.2.1.1. Le consortium microbien, niveau d'intégration plus pertinent que l'espèce .....	40
1.2.1.2. Des moyens d'études pour étudier ces consortia microbiens particuliers.....	40
a) Déduire l'abondance de populations par la présence de gènes caractéristiques .....	40
b) L'approche méta génomique et méta protéique .....	41
c) La diversité de cheminement du flux .....	41
d) Exécution d'une fonction macroscopique .....	42
<b><i>I.2.2. LA RÉACTION DES ÉCOSYSTÈMES MICROBIENS À UN CHOC MAJEUR .....</i></b>	<b>42</b>
1.2.2.1. Réaction impliquant un changement physiologique.....	42
1.2.2.2. Quelques exemples de réactions impliquant un changement d'abondance .....	45
<b><i>I.2.3. LES MÉCANISMES DE LA RÉSILIENCE DES SYSTÈMES MICROBIENS.....</i></b>	<b>48</b>
1.2.3.1. Forme de « résistance » moins active .....	48
1.2.3.2. Diminution de la richesse et succession d'espèces .....	48
<b><i>I.2.4. LES FACTEURS FAVORISANT LA RÉSILIENCE FONCTIONNELLE DES ÉCOSYSTÈMES MICROBIENS.....</i></b>	<b>50</b>
1.2.4.1. Un stress ponctuel antérieur.....	50
1.2.4.2. Des perturbations intermédiaires continues.....	52
a) Les communautés soumises aux perturbations ont des populations plus tolérantes .....	52
b) Les perturbations modifient la diversité au sein d'une population.....	52
1.2.4.3. Une richesse plus importante engendre une forte résilience fonctionnelle .....	52
1.2.4.4. Des voies métaboliques parallèles favorisent une forte résilience fonctionnelle.....	53
1.2.4.5. Environnement hétérogène .....	54
<b><i>I.3. CONCLUSION DE L'ÉTUDE ET STRATÉGIE ADOPTÉE POUR LA THÈSE .....</i></b>	<b>55</b>

**CHAPITRE II : DEVELOPPEMENT D'OUTILS POUR L'ANALYSE DES  
EMPREINTES MOLECULAIRES SSCP..... 57**

<b>II.1. INTRODUCTION.....</b>	<b>58</b>
II.1.1. PRELIMINAIRE.....	58
II.1.2. HYPOTHESES IMPLICITES CONCERNANT LES EMPREINTES MOLECULAIRES.....	60
<b>II.2. MOLECULAR FINGERPRINTING (DGE, SSCP) REVISITED BY SIMULATION AND USED AS TOOLS TO MEASURE MICROBIAL DIVERSITY (PUBLISHED IN ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY).....</b>	<b>63</b>
<b>II.3. LES DIFFICULTES D'UTILISATION DE LA SSCP.....</b>	<b>80</b>
<b>II.4. MESURER LA DIVERSITE (SIMPSON) PAR UNE EMPREINTE MOLECULAIRE.....</b>	<b>80</b>
<b>II.5. PROGRAMME SAFUM UTILISE POUR L'INTERPRETATION DES SPECTRES.....</b>	<b>82</b>
<b>II.6. CONCLUSION DE L'USAGE DE LA SSCP POUR L'ETUDE DE CONSORTIA COMPLEXES.....</b>	<b>88</b>

**CHAPITRE III : RESILIENCE D'UN CONSORTIUM MARIN SOUMIS A UN CHOC  
DE TOLUENE ..... 89**

<b>III.1. INTRODUCTION.....</b>	<b>90</b>
III.1.1. PRELIMINAIRE.....	90
III.1.2. LE CONSORTIUM DES BACTERIES HETEROTROPHES DU MILIEU MARIN.....	90
III.1.2.1. L'organisation du flux de carbone dans la colonne d'eau.....	90
III.1.2.2. Le flux de carbone, une des « fonctions » du milieu marin.....	91
<b>III.2. CONTEXTE EXPERIMENTAL DU MILIEU MARIN.....</b>	<b>93</b>
III.2.1. PRELEVEMENTS DE COMMUNAUTES AUX « HISTOIRES » CONTRASTEES.....	93
III.2.2. UN CHOC TRANSITOIRE DE TOLUENE EST ADAPTE POUR ETUDIER LA RESILIENCE DU MILIEU MARIN .....	93
III.2.3. LES CULTURES CONTINUES DE BACTERIES MARINES EN CHEMOSTAT.....	97
III.2.3.1. Les inconvénients des enceintes fermées non alimentées.....	97
III.2.3.2. Les avantages des chemostats continus.....	97
III.2.3.3. Description du dispositif de chemostat continu.....	97
III.2.3.4. Remarque sur le choix du débit.....	99
III.2.3.5. Remarques sur le substrat limitant.....	101
III.2.3.6. Intégrer les mesures quantitativement dans un modèle.....	102
III.2.4. SCHEMA EXPERIMENTAL TESTANT LA RESILIENCE DU BACTERIOPLANKTON MARIN.....	104
<b>III.3. ARTICLE: ALTEROMONAS SP. IS A KEY SPECIES FOR RESILIENCE OF CARBON MINERALIZATION IN TWO DIFFERENT SEAWATER BACTERIAL COMMUNITIES WITH CONTRASTING HISTORY.....</b>	<b>105</b>
<b>III.4. RESULTATS COMPLEMENTAIRES ET DISCUSSION.....</b>	<b>122</b>
III.4.1. LIMITATION DU CONTEXTE DE L'ETUDE.....	122
III.4.2. VARIATION DU VOLUME CELLULAIRE DANS NOS CHEMOSTAT SANS PREDATEURS.....	122
III.4.3. LA REPRODUCTIBILITE DE LA SURPRODUCTION APRES UN CHOC TOLUENE.....	123
<b>III.5. DIFFERENCES DE COMPOSITION ENTRE SOLA ET MOLA.....</b>	<b>127</b>
<b>III.6. DIFFERENCES D'HISTOIRE ENTRE SOLA ET MOLA.....</b>	<b>128</b>
<b>III.7. CONCLUSION QUANT A LA RESILIENCE DU BACTERIOPLANKTON MARIN.....</b>	<b>131</b>
<b>III.8. DEVELOPPEMENTS POTENTIELS DU MODELE « MILIEU MARIN ».....</b>	<b>132</b>

**CHAPITRE IV : RESILIENCE DE DIGESTEURS ANAEROBIES SOUMIS A UN  
CHOC ACIDE ..... 133**

<b>IV.1. INTRODUCTION.....</b>	<b>134</b>
IV.1.1. PRELIMINAIRE.....	134
IV.1.2. LE CONSORTIUM DE LA DIGESTION ANAEROBIE.....	134
IV.1.2.1. La fonction d'un système de dépollution.....	134
IV.1.2.2. La réaction du consortium anaérobie en cas de choc.....	135
<b>IV.2. CONTEXTE EXPERIMENTAL DE LA DIGESTION ANAEROBIE POUR ETUDIER L'EFFET DE PETITES PERTURBATIONS.....</b>	<b>138</b>
IV.2.1. LES AVANTAGES DE LA DIGESTION ANAEROBIE EN CHEMOSTAT SEMI-CONTINU.....	138
IV.2.2. DESCRIPTION DE NOTRE DISPOSITIF EXPERIMENTAL.....	138
IV.2.2.1. Schéma expérimental.....	138
IV.2.2.2. Description des chocs appliqués.....	141
<b>IV.3. ARTICLE : ECOLOGICAL RESILIENCE ENHANCED BY PERTURBATIONS IN ANAEROBIC BIOREACTORS.....</b>	<b>143</b>

<b>IV.4. RESULTATS COMPLEMENTAIRES ET DISCUSSION .....</b>	<b>157</b>
IV.4.1. DES SYSTEMES DYNAMIQUES AVANT LE CHOC ACIDE .....	157
IV.4.2. DES SYSTEMES « DIVERGENTS » AVANT LE CHOC ACIDE.....	158
IV.4.2.1. Divergence de la communauté bactérienne anaérobie .....	159
IV.4.2.2. Divergence du groupe Eubacterium-Clostridium.....	160
IV.4.2.3. Divergence du groupe Bacteroides-Prevotella .....	161
IV.4.3. DETAIL DES CHOCS ACIDES.....	162
IV.4.4. FLOCS, BIOFILM ET CELLULES LIBRES PENDANT LE CHOC .....	165
IV.4.5. COHERENCE DES INDICATEURS FONCTIONNELS APRES LE CHOC .....	165
IV.4.6. REACTION DIFFERENTE DES GROUPES MICROBIENS APRES LE CHOC ACIDE.....	166
<b>IV.5. CONCLUSIONS SUR L'ECOSYSTEME DIGESTION ANAEROBIE.....</b>	<b>169</b>
<b>IV.6. DEVELOPPEMENTS POTENTIELS MODELE « DIGESTION ANAEROBIE » .....</b>	<b>169</b>
<b>CHAPITRE V : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>171</b>
<b>V.1. CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>172</b>
<b>V.2. DEVELOPPEMENTS POTENTIELS A COURT TERME.....</b>	<b>172</b>
V.2.1. DEVELOPPEMENTS POTENTIELS A COURT TERME DU MODELE « MILIEU MARIN ».....	172
V.2.2. DEVELOPPEMENTS POTENTIELS A COURT TERME DU MODELE « DIGESTEUR ».....	173
<b>V.3. PROBLEMATIQUES SOULEVEES PAR L'APPROCHE « CHEMOSTAT » .....</b>	<b>174</b>
V.3.1. PROBLEMATIQUE DE L'ECHELLE D'OBSERVATION.....	174
V.3.2. PROBLEMATIQUE DE LA METHODE D'OBSERVATION.....	175
V.3.3. LES LIMITES DES MODELES D'ETUDES EN CHEMOSTATS .....	176
V.3.4. PROBLEMATIQUE DU SEUIL D'INTENSITE POUR MARQUER LE SYSTEME .....	177
V.3.5. PROBLEMATIQUE DE LA RELATION INTENSITE DU CHOC- DUREE DE LA « MEMOIRE » .....	177
V.3.6. UNE DIVERGENCE DUE AU CHAOS DETERMINISTE ? .....	178
V.3.7. UNE DIVERGENCE DUE A UNE EVOLUTION « NEUTRE » ?.....	179
V.3.8. DES POPULATIONS « STABLES » NICHEES DANS UN CONSORTIUM DE DYNAMIQUE NEUTRE? .....	179
<b>REFERENCES.....</b>	<b>181</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>199</b>
<b>ANNEXE 1 : PROTOCOLE D'ISOLEMENT D'UN PHAGE D'UNE BACTERIE D'INTERET .....</b>	<b>200</b>
V.3.9. INTRODUCTION.....	200
V.3.10. ARTICLE: EFFICIENT METHOD TO ISOLATE AND PURIFY BACTERIOPHAGES IN AQUATIC SYSTEMS. .....	200
V.3.11. CONCLUSION .....	212
<b>V.4. ANNEXE 2 : CONSEQUENCE DE LA CHARGE D'UN VIRUS ET DE SON HOTE BACTERIEN SUR LEUR RENCONTRE.....</b>	<b>213</b>
V.4.1. MESURE DE LA CHARGE D'UNE BACTÉRIE EN ÉVALUANT SON DÉPLACEMENT DANS UN CHAMP ÉLECTRIQUE.....	213
V.4.2. MESURE DU POTENTIEL ZETA D'UN VIRUS PAR DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE .....	214
V.4.3. INTERPRETATION DES POTENTIELS DE BACTERIES ET DE VIRUS EN TERMES DE PROBABILITE DE RENCONTRE .....	215
<b>V.5. ANNEXE 3 : SUIVI DE PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX SUR LE LITTORAL ET AU LARGE (F.LANTOINE) .....</b>	<b>216</b>
<b>ANNEXE 4 : MATURATION D'UN SYSTEME « R » VERS UN SYSTEME « K » .....</b>	<b>222</b>
<b>V.6. ANNEXE 5 : EQUATIONS DU MODELE NEUTRE.....</b>	<b>223</b>
<b>V.7. ANNEXE 6 : PUBLICATION CORRESPONDANT AUX SIMULATIONS PRESENTEES AU CHAPITRE II .....</b>	<b>225</b>
<b>V.8. ANNEXE 7 : AMORCES UTILISEES POUR LA SSCP .....</b>	<b>237</b>
<b>V.9. ANNEXE 8: SAFUM v4.3 MANUAL .....</b>	<b>238</b>
V.9.1. WHAT DO I NEED TO RUN SAFUM?.....	238
V.9.1.1. What toolboxes ?.....	238
V.9.1.2. HOW DO I START SAFUM, once Matlab 6.5 is installed on my computer? .....	238
V.9.2. IMPORTATION OF DATA FROM AN ABI SEQUENCER .....	238
V.9.2.1. IMPORTATION from an image.....	239
a) Screenshot of the fingerprint .....	239
b) Importation of the screenshot in Matlab and conversion into a vector .....	239
V.9.2.2. IMPORTATION from an fsa file.....	239
a) Install Chromagna .....	239

b) Convert fsa file into csv using Chromagna .....	239
c) Import csv file into Matlab .....	240
V.9.2.3. Alignment of fingerprints using the internal size standard .....	240
a) Alignment using the first profile as the reference.....	240
b) Alignment using the safum standard .....	242
V.9.2.4. Setting the Baseline and region of interest.....	242
<b>V.9.3. DATA MANAGEMENT.....</b>	<b>243</b>
V.9.3.1. Saving the aligned profiles database.....	243
a) Save data in Matlab format.....	243
b) Save data with Excel format .....	243
V.9.3.2. Importing the aligned profiles database.....	243
a) Data in Matlab format .....	243
b) Data in excel format.....	243
<b>V.9.4. DATA VISUALIZATION.....</b>	<b>243</b>
V.9.4.1. Plot 2D .....	243
V.9.4.2. Plot3D .....	243
<b>V.9.5. DATA TRANSFORMATION.....</b>	<b>245</b>
V.9.5.1. Baseline redefinition .....	245
V.9.5.2. Migration Problems (even if the internal standard is aligned).....	245
a) Average of two consecutive scans .....	245
b) Peak alignment.....	245
V.9.5.3. Amplification of the small peaks .....	246
<b>V.9.6. DATA STATISTICS.....</b>	<b>246</b>
V.9.6.1. Export distance or similarity matrix from all profiles.....	246
V.9.6.2. Dendrogram .....	246
V.9.6.3. Principal Component Analysis.....	246
V.9.6.4. Detection of the “real peaks” .....	247
V.9.6.5. Relative area of the “real peaks” .....	248
V.9.6.6. Export the background area from all profiles .....	248
V.9.6.7. Detail of particular profiles.....	248

**GLOSSAIRE ..... 250**

## Liste des abréviations

ACP	Analyse en Composante Principale
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomal
AFBGAC	Réacteur (anaerobic fluidized bed granular activated carbon bioreactor)
AGV	Acides gras volatiles
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
BET	Bromure d'Ethidium
COD	En anglais, Chemical Oxygen Demand ; en français, Carbone Organique Dissous
CSTR	Réacteur agité homogène (Completely stirred tank reactor)
DAPI	Diamidino-4,6-phénylindol-2 dichlorhydrate
FBR	Réacteur en lit fluidise (Fluidized Bed reactor)
FISH	Hybridation fluorescente <i>in situ</i> (Fluorescent <i>in situ</i> hybridization)
FVA	Fatty volatil Acids (voir AGV)
IDH	Hypothèse des perturbations intermédiaires (intermediate disturbance)
ITS	Intergenic Transcriber Spacer
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerization Chain Reaction)
SBR	Réacteur en batch semi continu (sequence batch reactor)
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
STEP	Station d'Épuration
SWB	Milieu de culture à base de peptone et d'extraits de levure (SeaWater Broth)
UASB	Upward-flow Anaerobic Sludge Blanket
UV	Ultra-Violet

## Liste des Figures du Chapitre I :

Figure I.1-1 : Equilibre stable et instable d'une bille.....	21
Figure I.1-2 : Analogie de la bille pour décrire un écosystème (Scheffer et al., 2001) .....	22
Figure I.1-3 : Stabilité globale et locale selon Townsend (Townsend).....	24
Figure I.1-4 : Schéma de la résilience écologique .....	25
Figure I.1-5 : Temps et valeurs caractéristiques pour une variable de réponse (Orwin and Wardle, 2004) .....	27
Figure I.1-6 : Enveloppe d'amplification d'après Hashsham (Hashsham et al., 2000) .....	28
Figure I.1-7 : Modèles d'organisation écologique d'après Peterson et al. (1998).....	33
Figure I.1-8 : Schéma de flux redondants au niveau des espèces (A) et au niveau des voies métaboliques au sein d'individus (B).....	35
Figure I.1-9 : Fréquence des temps de retour pour des réseaux à deux, trois ou quatre niveaux trophiques (Pimm and Lawton, 1977), synthétisés par Townsend .....	36
Figure I.1-10 : Probabilité de stabilité en fonction de la complexité dans des microcosmes aquatiques (Fox and McGrady-Steed, 2002).....	37
Figure I.1-11 : Modification de la relation temps de retour- connectance par les prédateurs.....	38
Figure I.2-1 : Changement du transcriptome en cas de choc thermique (Koide et al., 2006) .....	43
Figure I.2-2 : Tolérance physiologique, capacité d'assimilation de sources carbonées et indice de diversité d'une communauté perturbée (Atlas et al., 1991) .....	44
Figure I.2-3 : Diminution temporaire de la richesse du phytoplancton dans des mésocosmes soumis à des biocides (Wilson et al., 2004) .....	45
Figure I.2-4 : Réaction d'une communauté dénitrifiante à des divers chocs (Gentile et al., 2006).....	46
Figure I.2-5 : Accumulation de produits intermédiaires après l'addition de glucose .....	46
Figure I.2-6 : Résilience écologique forte des écosystèmes divers .....	47
Figure I.2-7 : Résilience de sols fumigés ou irradiés puis ré-inoculés avec différentes dilutions en réponse à un choc température (Griffiths et al., 2004). .....	47
Figure I.2-8 : Changement d'abondance de quelques phylotypes bactériens lors d'une crise d'acétate dans un réacteur anaérobie (Delbès et al., 2001b).....	49
Figure I.2-9 : Variétés des mécanismes potentiellement mis en jeu pour la résilience .....	49
Figure I.2-10 : Hypothèse des stress intermédiaires (Giller et al., 1998).....	53

## Liste des Figures du Chapitre II :

Figure II.1-1 : Les différentes techniques d'empreintes moléculaires (Cresson, 2006).....	59
Figure II.1-2 : Corrélacion entre aire de pic et pourcentage de cellules pour <i>Prochlorococcus</i> (Brown et al., 2005) .....	61
Figure II.2-1 : Simulated SSCP pattern based on 5,000 units following a bimodal and uniform distribution law.....	65
Figure II.2-2: Simulated SSCP and DGE patterns. ....	66
Figure II.2-3 : Number of peaks and background area as depending on number of units.....	67
Figure II.2-4 : Simulated SSCP pattern with a few very dominant units .....	68

Figure II.2-5 : Comparison of uniform, geometric or lognormal density law.....	69
Figure II.2-6 : SSCP patterns from various experimental samples .....	73
Figure II.2-7 : SSCP patterns from pig feces sample as composition of various groups .....	74
Figure II.4-1 : Indice de Simpson en éliminant l'aire sous les pics (symboles pleins) ou en tenant compte de l'aire sous les pics (symboles creux).....	81
Figure II.5-1 : Block diagram of SAFUM.....	84
Figure II.5-2 : Example of SAFUM's output.....	85

### Liste des Figures du Chapitre III :

Figure III.1-1 : La chaîne alimentaire et la boucle microbienne dans le milieu marin (Azam, 1983) ....	91
Figure III.1-2 : Augmentation de la production bactérienne dans des mésocosmes (Lebaron et al., 2001b) .....	92
Figure III.2-1 : Sites de prélèvement des communautés du littoral et du large.....	93
Figure III.2-2 : Exposition d'une communauté marine au diesel (Nayar et al., 2005) .....	94
Figure III.2-3 : Structure chimique et spectre d'adsorption du toluène .....	95
Figure III.2-4 : réaction de la diversité du gène <i>tmoA</i> au passage d'une contamination de toluène ....	96
Figure III.2-5 : Schéma d'un chemostat continu et photo des quatre chemostats inoculés avec un consortium de bactéries marines hétérotrophes.....	98
Figure III.2-6 : Débit de la pompe capillaire alimentant les chemostats continus .....	98
Figure III.2-7 : Fonction de croissance $\mu(S)$ .....	100
Figure III.2-8 : Culture continue de bactéries marines avec de l'eau de mer filtrée (Hagstroem et al., 1984) .....	101
Figure III.2-9 : Modélisation des chemostats marins intégrant les différentes mesures .....	102
Figure III.2-10 : Schéma expérimental testant la résilience du bactérioplancton littoral et du large...	104
Figure III.3-1 : High-range (PMT=400V) and low-range (insert, PMT=700V) calibration plots for estimation of toluene concentration through spectrofluorometry. ....	109
Figure III.3-2 : Experimental bacterial density (A) and production (B) in the chemostats inoculated with shore and offshore bacterial communities .....	114
Figure III.3-3 : Fingerprint in the two shore communities (A-F and G-L) and one offshore community (M-R) .....	115
Figure III.3-4 Modelled Biomass, density and production and measured toluene concentration (dashdot line) for shore communities (A, B and C) and for offshore communities (D, E and F)..	117
Figure III.4-1 : Variation du paramètre SSC-H (taille cellulaire) au cours de l'incubation.....	123
Figure III.4-2 : Composition et activité dans les chemostats sans choc toluène.....	125
Figure III.4-3 : Réactions de consortia marins à différents chocs de toluène .....	126
Figure III.4-4 : Concentrations de toluène différentes dans deux réacteurs .....	127
Figure III.5-1 : Variation spatiale de la structure des communautés marines entre SOLA et MOLA (Ghiglione et al., 2005) .....	128
Figure III.6-1 : Fluctuations de quelques paramètres perçus par les bactéries à SOLA .....	129
Figure III.7-1 : Mécanismes de résilience dans les communautés marines .....	131

#### Liste des Figures du Chapitre IV:

Figure IV.1-1 : Modèle de digestion anaérobie de Zeikus (Zeikus, 1980) .....	135
Figure IV.1-2 : Modèle de Angelidaki (Angelidaki et al., 1999) .....	136
Figure IV.2-1 : Production de biogaz et d'acides gras volatils durant la digestion anaérobie de vinasse(Ruiz et al., 2002).....	138
Figure IV.2-2 : Schéma expérimental de notre étude de résilience du milieu anaérobie .....	139
Figure IV.2-3 : Schéma d'un digesteur anaérobie et photo du montage expérimental.....	140
Figure IV.2-4 : Interprétation des données de gaz et de pH acquis en ligne .....	141
Figure IV.2-5 : Représentation schématique des « petites » perturbations appliquées sur deux digesteurs .....	142
Figure IV.3-1 : Effect of small perturbations on maximal specific activity of bioreactors .....	146
Figure IV.3-2 : Typical SSCP fingerprints of anaerobic bioreactors.....	147
Figure IV.3-3 : Principal component Analysis of SSCP fingerprints of bioreactors.....	148
Figure IV.3-4 : Resilience of anaerobic bioreactors to an acidic shock .....	150
Figure IV.4-1 : Evolution des profils SSCP par rapport au profil initial.....	158
Figure IV.4-2 : Divergence structurelle de la communauté bactérienne entre les réacteurs $S_c$ .....	159
Figure IV.4-3 : ACP des spectres SSCP de bioréacteurs « stables » .....	160
Figure IV.4-4 : Divergence structurelle de la communauté <i>Eubacterium-Clostridium</i> .....	161
Figure IV.4-5 : Divergence structurelle de la communauté <i>Bacteroides-Prevotella</i> .....	162
Figure IV.4-6 : Choc acide artificiel de 24h sur les réacteurs $S_s$ -P et $S_s$ -NP.....	163
Figure IV.4-7 : Choc acide artificiel de 72h sur les réacteurs $S_s$ -P et $S_s$ -NP.....	163
Figure IV.4-8 : Détail de la catastrophe « naturelle » sur les réacteurs $S_c$ -P et $S_c$ -NP .....	164
Figure IV.4-9 : Variation du gaz dans l'espace de tête lors d'un choc pH .....	164
Figure IV.4-10 : Résilience de la consommation d'acide (méthanisation), observée suite la variation de pH artificielle de 72h.....	166
Figure IV.4-11 : Réaction de la micro-diversité à un choc pH majeur révélée par SSCP.....	167
Figure IV.5-1 : Effet de petites perturbations sur la résilience fonctionnelle de digesteurs anaérobies .....	169

#### Liste des Figures du Chapitre V :

Figure V.2-1 : La résilience d'ingénierie du système peut dépendre de la déformation .....	174
Figure V.3-1 : Des niches spécifiques au sein du réseau trophique .....	180
Figure V.5-1 : Potentiel d'un virus en fonction de la distance par rapport à son hôte .....	215
Figure V.7-1 : Modèle neutre de Hubbell, notations de Volkov (Volkov et al., 2003).....	224

## Liste des équations :

Équation I.1-1 : Force ramenant une bille vers l'équilibre .....	21
Équation I.1-2 : Force éloignant une bille de l'équilibre .....	21
Équation I.1-3 : Indice de résilience d'Orwin .....	28
Équation I.1-4 : Fonction de croissance de Verhulst (1838) .....	29
Équation II.4-1 : Indice de diversité de Simpson .....	81
Équation III.2-1 : Equation d'une biomasse dans un chemostat continu .....	99
Équation III.2-2 : Condition d'équilibre de la biomasse pour un modèle simple de chemostat.....	100
Équation III.2-3 : Conséquence d'un taux de croissance imposé .....	100
Équation V.2-1 : Définition de la résistance .....	174
Équation V.7-1 : Evolution neutre d'une communauté.....	223

## Liste des Tables :

Table I-1 : Modification de la résilience par un stress antérieur lointain .....	51
Table II-1: Validation of the Curtis estimator for fingerprinting simulation patterns with lognormal distribution .....	71
Table II-2: Measurement of bacterial diversity using the Curtis estimator from molecular inventories and SSCP patterns.....	72
Table II-3 : Diversity of subgroups of the bacterial diversity in pig feces .....	75
Table III-1 :Model equations .....	112
Table III-2 : Parameters used in the model .....	113
Table IV-1 : Perturbations appliquées sur des bioréacteurs .....	137
Table IV-2 : Summary of resilient anaerobic bioreactors .....	151
Table V-1 : Différentes échelles de « diversité » .....	175
Table V-2: Evénements influençant la structure et la « physiologie » des communautés bactériennes .....	178

---

## Avant-propos

L'hypothèse Gaïa suggère que la planète réagit comme un organisme unique qui maintient un fonctionnement stable malgré des changements extérieurs. Cette hypothèse a été décrite pour la première fois par James Lovelock dans son livre « Gaia: A new look at life on Earth » en 1979 (Lovelock 1979). Elle se basait initialement sur la remarquable stabilité de la température terrestre au cours de 4 milliards d'années alors que la température du soleil avait augmenté de 25%. Après avoir été ardemment critiquée, l'hypothèse Gaïa a évolué et est aujourd'hui largement reconnue dans le domaine scientifique. L'écosystème « Terre » subit une pression anthropique sans précédent qui a notamment pour conséquence un réchauffement climatique brutal menaçant de modifier radicalement les cycles biogéochimiques. Dans son livre «The revenge of Gaia: Why the Earth is fighting back - And how we can still save humanity» paru en 2006, Lovelock met l'accent sur les dangers et les moyens de lutter contre ce réchauffement climatique (Lovelock 2006).

A plus petite échelle, les écosystèmes locaux peuvent également subir des perturbations qui, bien que temporaires, modifient durablement le fonctionnement de l'écosystème. Par exemple, un incendie modifie de façon durable les interactions au sein l'écosystème. Selon son « type » (prairie ou jungle), l'écosystème peut retrouver plus ou moins rapidement son état initial.

D'une manière générale, augmenter la productivité d'un système devient aujourd'hui secondaire par rapport à assurer la stabilité de son fonctionnement en cas de perturbation. A l'instar du chêne et du roseau, cette stabilité peut être due à la capacité du système de fonctionner malgré des conditions changeantes (chêne) ou bien à la capacité de revenir à l'état initial (roseau), c'est-à-dire la résilience. On peut également comparer un écosystème à une bille dans une vallée. Lorsque la bille est au milieu d'une vallée, elle est à l'équilibre. Le déplacement qu'elle subit en cas de perturbation représente la déformation du système. La bille et le roseau sont résilients s'ils retournent à leur équilibre initial après un choc qui les modifie temporairement.

Aujourd'hui nous savons que les micro-organismes sont omniprésents, des grandes profondeurs océaniques aux nuages et jouent un rôle central dans le fonctionnement des écosystèmes. Leur rôle majeur dans les processus biogéochimiques tel que la minéralisation de la matière organique (Azam, 1983) rend leur résilience cruciale pour l'homéostasie de la planète terre (Stolz, 1984). Depuis quelques décennies, l'Homme utilise ces consortia microbiens pour traiter des déchets variés (Wagner and Loy, 2002 , Leitao et al., 2006b) ou pour stimuler la croissance de certaines plantes (Glick, 1995, Rekha et al., 2007). Pour que ces systèmes microbiens puissent être utilisés, il faut que leur fonctionnement soit fiable. Pour fixer les idées, un choc température accidentel de 90°C pendant deux heures sur un digesteur anaérobie inhibe le fonctionnement de ce digesteur de manière irréversible (expérience personnelle). Sans aller jusqu'à ces extrêmes, il est aujourd'hui plus intéressant de disposer d'une station d'épuration de rendement moyen mais fiable que d'un système à fort rendement mais fragile au moindre choc. Cependant, les études concernant la résilience de systèmes microbiens restent rares à ce jour.

Les systèmes microbiens s'avèrent constituer des modèles particulièrement intéressants pour étudier la résilience car en plus de l'enjeu important représenté par les applications possibles, ils sont facilement manipulables et observables pendant un grand nombre de générations.

D'un point de vue fondamental, étudier la réponse à un choc (« stress ») des populations bactériennes permet de mieux comprendre comment ces communautés se structurent. Les fluctuations environnementales étant inévitables, il est important de comprendre comment les populations d'un écosystème réagissent à un stress. Associer la réponse populationnelle à une réponse fonctionnelle permet de comprendre dans quelle mesure la composition de la communauté est importante. Les progrès de la biologie moléculaire ont mis à jour une diversité insoupçonnée, mais la signification et le rôle de cette diversité dans les grands cycles biogéochimiques demeure un mystère.

D'un point de vue appliqué, une des priorités de la gestion des écosystèmes est d'entretenir la résilience. En effet, si un petit choc peut faire basculer le système dans un autre mode de fonctionnement, le système n'est pas fiable (Scheffer et al., 2001). Or un système peu fiable est peu intéressant en pratique. Entretenir la résilience du système est donc un des objectifs de l'ingénieur des procédés.

Malgré leur importance universelle et leur utilité indéniable, les systèmes microbiens restent souvent considérés comme une boîte noire où beaucoup de mécanismes inconnus sont à l'œuvre. Etudier la résilience des systèmes microbiens face aux chocs représente donc non seulement un intérêt appliqué mais aussi un moyen original d'identifier les espèces clés en cas de choc, et donc d'ouvrir une partie de « la boîte noire » (Tiedje et al., 1999).

L'échelle d'observation est une des difficultés majeures pour l'étude des systèmes microbiens. Ainsi, les espèces clés qui jouent un rôle majeur en cas de choc peuvent conférer au système microbien des propriétés de type « organisme r », c'est-à-dire une faible adaptation mais une grande adaptabilité ou des propriétés de type « organisme K », c'est-à-dire une grande adaptation mais une faible adaptabilité. L'orientation du système vers l'adaptation ou l'adaptabilité dépend probablement des fluctuations environnementales. En effet, il est couramment admis que l'« investissement » dans l'adaptation n'est rentable que si les fluctuations environnementales ne rendent pas l'adaptation immédiatement « obsolète ». Dès lors, on peut se demander si les conditions environnementales orientent les systèmes microbiens vers un état « adapté » (conditions stables, environnement prévisible) ou vers un état « adaptable » (conditions instables, environnement imprévisible).

Les fluctuations environnementales orientent-elles le système vers un certain état ? L'histoire de l'écosystème influe-t-elle sur les propriétés de résilience ? Ces questions sont au centre d'un programme ACI associant plusieurs laboratoires qui se propose d'observer la résilience de quatre systèmes microbiens différents en termes de population et de fonctionnement :

Dans les systèmes aquatiques, il est possible de prélever des communautés microbiennes dans des sites d'histoires différentes. Nous avons observé dans quelle mesure les fluctuations naturelles de l'environnement littoral et de l'environnement du large modifient la résilience de la minéralisation de la matière organique par le bactérioplancton libre. Cette étude a été réalisée au sein de l'OOB (Observatoire Océanologique de Banyuls/mer) dont une partie de l'activité porte sur l'étude

des communautés microbiennes, et notamment bactériennes. Ces travaux portent à la fois sur l'étude de la diversité des bactéries marines, et sur leur rôle fonctionnel dans les grands cycles biogéochimiques. De plus, le laboratoire possède une très bonne expertise dans les méthodes d'analyse à l'échelle moléculaire par « fingerprint » (Ghiglione et al., 2005), à l'échelle cellulaire par cytométrie et dans la construction de mésocosmes (Lebaron and Joux, 1994, Lebaron et al., 1999, Lebaron et al., 2001b). Cette double expertise a permis de mettre en évidence que la composition finale dépend fortement de la composition initiale en bactéries, en protistes et en nutriments disponibles (Lebaron et al., 1998, Lebaron et al., 2001b, Schafer et al., 2001, Vazquez-Dominguez et al., 2005) et que les cellules de taille moyenne sont sujettes à une prédation intense (Bernard et al., 2001). L'utilisation de mésocosmes a également permis de montrer que certains genres comme *Alteromonas* peuvent jouer un rôle prépondérant (Lebaron et al., 1999). Ce laboratoire est donc extrêmement bien positionné pour étudier la résilience des consortia bactériens à l'aide de mésocosmes.

Dans les digesteurs anaérobies, il est possible de créer des fluctuations artificielles et donc d'imposer des « histoires » différentes. Nous avons étudié les conséquences de fluctuations artificielles continues (ou continues) de petite amplitude sur l'évolution d'un inoculum pendant trois mois dans quatre réacteurs parallèles. Nous avons réalisé cette étude au sein du LBE (Laboratoire de biotechnologie de l'environnement) de Narbonne, qui possède une grande expertise des réacteurs de laboratoire (équipe d'automatique développant des outils informatiques sur mesure en utilisant des langages de type ModularPC© ou Matlab™) et qui a été pionnier dans l'analyse des consortia microbiens de digesteurs anaérobies par des techniques moléculaires comme les inventaires et les empreintes moléculaires (Godon et al., 1997b, Godon et al., 1997a, Dabert et al., 2001b, Bernet et al., 2004, Godon et al., 2005). Les inventaires ont révélé une diversité insoupçonnée dans les stations d'épuration anaérobies (Godon et al., 1997a) et les empreintes moléculaires ont montré une dynamique du consortium bactérien (Delbès et al., 2000, Delbès et al., 2001a, Leclerc et al., 2001). Ce laboratoire offre donc un environnement idéal pour étudier la résilience des consortia bactériens de digestion anaérobie au moyen de réacteurs de laboratoire.

Philippe Lemanceau et Lionel Ranjard (UMR de Microbiologie et Géochimie des sols, INRA/Dijon) ont soumis les communautés microbiennes du sol à un stress de petite amplitude avant de les exposer à une forte concentration de mercure. Le fonctionnement a été suivi en tant que minéralisation de l'atrazine.

L'équipe de Joël Doré (Unité d'Ecologie et de Physiologie du Système Digestif, INRA/Jouy en Josas) a utilisé des rats gnotobiotiques pour étudier la résilience de la flore digestive humaine. Ces rats ont été nourris de façon fluctuante avant d'être soumis à une forte dose d'Augmentin®, qui est un antibiotique utilisé en médecine.

L'association de ces quatre laboratoires experts permet de poser la question de l'importance des événements externes quant à la résilience fonctionnelle.

Le travail qui nous a été proposé est de déterminer si l'écosystème garde une « mémoire » des événements par la physiologie des organismes qui le composent et/ou par la structure du réseau trophique. A priori, l'histoire peut agir sur les propriétés de croissance (comment les espèces se

multiplient), la richesse spécifique (combien d'espèces sont présentes) et la diversité spécifique (quelles espèces sont présentes). Les mécanismes et la portée exacte de l'histoire sur les propriétés de résilience restent cependant un mystère.

Pour apporter des éléments de réponse, nous avons étudié en parallèle sur deux systèmes l'importance de l'histoire de communautés microbiennes dans deux environnements contrastés : le milieu marin naturel et le milieu des boues anaérobies d'ingénierie (station d'épuration).

S'il s'avère que l'histoire modifie la résilience fonctionnelle, cela montrera la nécessité d'une approche holistique par rapport à une approche réductionniste. En effet, si une histoire différente sélectionne des communautés de composition et de résilience fonctionnelle différentes, il sera nécessaire de prendre en compte la composition du compartiment microbien pour prédire la réaction du système. De plus, si les chocs modifient durablement la communauté microbienne, les résultats de la littérature obtenus par des perturbations en série seront à reconsidérer avec un nouveau regard.

Nous allons d'abord synthétiser les données relatives à la résilience fonctionnelle en présentant les données théoriques et les observations sur les écosystèmes macroscopiques avant de considérer en quoi les systèmes microbiens sont particuliers. Nous présenterons quelques exemples détaillés pour illustrer la résilience fonctionnelle de ces systèmes microbiens.

Nous présenterons ensuite notre travail en utilisant le bactérioplancton libre hétérotrophe du milieu marin comme modèle pour étudier la résilience fonctionnelle, avec une brève introduction présentant le milieu marin, l'article soumis et quelques résultats complémentaires qui seront discutés.

Les hypothèses posées par ce travail nous amèneront à étudier le consortium de digestion anaérobie, où nous présenterons rapidement le système et la question centrale de l'article soumis avant de revenir sur quelques points de discussion complémentaires.

L'annexe 1 présente un protocole pour isoler le virus d'une souche bactérienne d'intérêt.

L'annexe 2 détaille l'utilisation de ce protocole pour mesurer la charge de surface de bactéries intéressantes et des virus associés et poursuit la réflexion en considérant la probabilité de rencontre entre ces deux particules chargées.

L'annexe 3 fournit le suivi de quelques paramètres environnementaux à des stations marines littorales et hauturières.

L'annexe 4 reproduit un tableau comparant les stratégies « r » et « K ».

L'annexe 5 précise les équations probabilistes du modèle neutre.

L'annexe 6 reproduit les travaux de simulation présentés dans le chapitre II sous forme de publication (parue en 2006)

L'annexe 7 récapitule les amorces de PCR utilisées pour effectuer ce travail.

L'annexe 8 fournit le manuel d'utilisation du logiciel de manipulation des spectres CE-SSCP.

**Articles liés à la thèse**

**Denaturing gradient electrophoresis (dge) and single-strand conformation polymorphism (sscp) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity.**

Loisel, P., Harmand, J., Zemb, O., Latrille, E., Lobry, C., Delgenes, J.P., Godon, J.J.

Publié dans *Environmental Microbiology* (2006), 8, 720-731.

**SAFUM: Statistical analysis of SSCP fingerprints using PCA projections, dendrograms and diversity estimators.**

Zemb, O., Haegeman, B., Lebaron, P., Godon, J.J.

Soumis à *Molecular Ecology Notes*

***Alteromonas* sp. is a key species for resilience of carbon mineralization in two different seawater bacterial communities with contrasting history**

Zemb, O., West, N., Bourrain, M., Godon, J.J., Lebaron, P.

En préparation pour *Aquatic Microbial Ecology*

**Ecological resilience enhanced by perturbations in anaerobic bioreactors**

Zemb, O., Delgenes, J.P., Lebaron, P., Godon, J.J.

Soumis à *Environmental Microbiology*

**Efficient method to isolate and purify bacteriophages in aquatic systems.**

Zemb, O., Urios, L., Coetsier, C., Lebaron, P.

Soumis à *Journal of Applied Microbiology*

**Major differences of bacterial diversity and activity inside and outside of a naturally iron-fertilized bloom in the Southern Ocean**

West, N.J., Obernosterer, I., Zemb, O., Lebaron, P.

En préparation

---

## **CHAPITRE I : Synthèse bibliographique**

### **I.1. LE CONCEPT DE RESILIENCE FONCTIONNELLE ET SON APPLICATION SUR DES SYSTEMES DE MACRO-ORGANISMES..... 20**

- I.1.1. CONCEPT DE STABILITE, ETAT D'EQUILIBRE, RESISTANCE ET RESILIENCE
- I.1.2. LES FACTEURS FAVORISANT UNE RESILIENCE FONCTIONNELLE FORTE CHEZ LES MACRO-ORGANISMES
- I.1.3. CONCLUSION SUR LES THEORIES SE RAPPORTANT A LA RESILIENCE FONCTIONNELLE ET SUR LES OBSERVATIONS DE MACRO-SYSTEMES

### **I.2. LA RESILIENCE FONCTIONNELLE DES ECOSYSTEMES MICROBIENS.....40**

- I.2.1. LES PARTICULARITES DES ECOSYSTEMES MICROBIENS
- I.2.2. LA REACTION DES ECOSYSTEMES MICROBIENS A UN CHOC MAJEUR
- I.2.3. LES MECANISMES DE LA RESILIENCE DES SYSTEMES MICROBIENS
- I.2.4. LES FACTEURS FAVORISANT LA RESILIENCE FONCTIONNELLE DES ECOSYSTEMES MICROBIENS

### **I.3. CONCLUSION DE L'ETUDE ET STRATEGIE ADOPTEE POUR LA THESE.....55**

Le terme « résilience » provient du verbe latin « *resilire* » qui signifie « rebondir » ou « revenir à l'état initial après une perturbation ». Ce terme est employé dans le domaine de la physique, de la psychologie et de l'écologie. En écologie, la définition de résilience a évolué d'un concept qualitatif vers une mesure quantitative (Gunderson, 2000). Par extension, le terme de « résilience » désigne parfois la mesure qu'adoptent les auteurs pour qualifier le retour à l'état initial. Ainsi, la résilience peut être à la fois la capacité à revenir dans le même état d'équilibre que la vitesse de retour à cet état. De plus, le terme de résilience peut être appliqué à des populations ou à des fonctions. Nous nous limiterons à la résilience fonctionnelle. La résilience des populations ne sera considérée que si elle permet d'expliquer la résilience fonctionnelle. Les fonctions étudiées sont des fonctions utiles à l'homme, souvent liées à la productivité ou à la dégradation de composés anthropiques.

## **I.1. Le concept de résilience fonctionnelle et son application sur des systèmes de macro-organismes**

Dans cette partie, nous étudierons le concept de résilience par rapport à un choc, et nous nous intéresserons aux concepts théoriques et aux observations sur des systèmes réels de macro-organismes.

### **I.1.1. Concept de Stabilité, état d'équilibre, résistance et résilience**

Il est important de remarquer qu'un équilibre implique une constance dans le temps. Un équilibre peut être stable ou instable. La stabilité se définit par rapport aux conséquences lors d'un petit déplacement du système. Elle peut être définie en considérant la capacité du système à rester dans un état malgré un choc ou la capacité du système à regagner rapidement son état initial après un choc.

#### ***I.1.1.1. Définition physique d'un équilibre stable en tant que résilience malgré un choc***

La résilience est considérée comme le retour à l'état initial après une perturbation. Il nous faut donc définir un état initial ou équilibre initial. Cela peut être réalisé pour des systèmes comportant un ou plusieurs objets (dont l'état se décrit par une variable).

##### **a) Pour une variable à une dimension**

Un objet est en équilibre lorsque la résultante des forces est nulle, soit  $F=0$ . Ceci peut s'appliquer à tout système soumis à une force  $F$  qui dépend d'une variable  $X$  tel que  $Y=f(X)$ . Cette situation peut être illustrée par une bille posée sur une surface ondulée.  $X$  représente l'abscisse de la bille et  $F$  représente la force s'exerçant sur cette bille.

L'ordonnée peut représenter une variable de réponse du système. Par exemple, la variable de réponse peut être la respiration induite par l'addition de glucose. Pour une communauté du sol soumise à un assèchement temporaire (choc), la respiration induite par l'addition de glucose (variable de réponse) diminue puis retourne à sa valeur initiale (Orwin and Wardle, 2004). Si on compare ce

système à une bille, l'assèchement temporaire représente la force qui déplace la bille. La bille déplacée a une valeur de la variable de réponse (la respiration induite) qui diffère de l'équilibre. La variable de réponse revient à l'équilibre après une cinquantaine d'heures, ce qui correspond à la bille revenue à son équilibre au centre de la vallée.

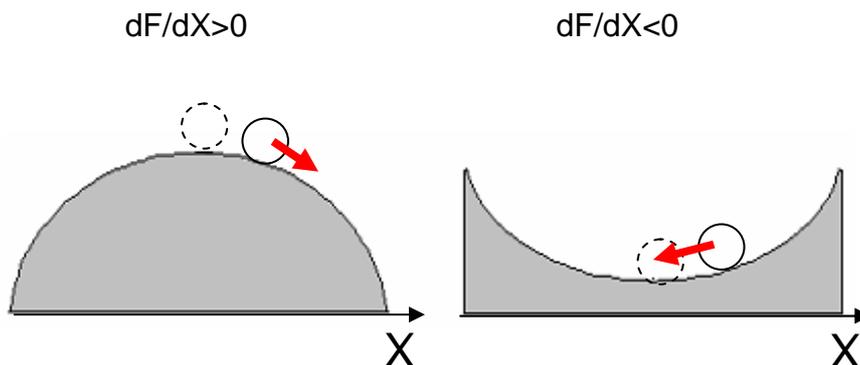
Ainsi, lorsque la surface est plane (i.e.  $dY/dX=0$ ), la bille est en équilibre. L'équilibre peut être qualifié de stable (Équation I.1-1) ou de métastable (Équation I.1-2) selon que la bille revient ou s'éloigne de sa position d'équilibre lorsqu'elle est légèrement déplacée (Figure I.1-1).

**Équation I.1-1 : Force ramenant une bille vers l'équilibre**

$$F = 0 \quad \text{et} \quad \frac{dF}{dX} < 0$$

**Équation I.1-2 : Force éloignant un bille de l'équilibre**

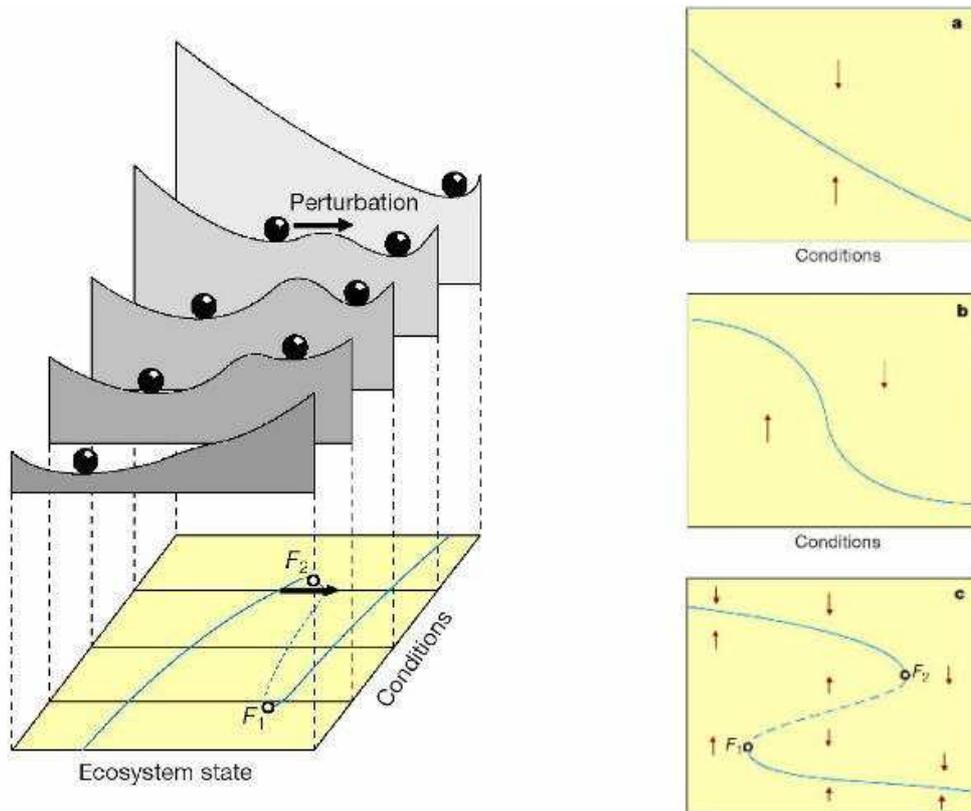
$$F = 0 \quad \text{et} \quad \frac{dF}{dX} > 0$$



**Figure I.1-1 : Equilibre stable et instable d'une bille**

La bille représente l'écosystème. L'abscisse représente son état. Un déplacement sur l'axe des abscisses correspond donc à une modification de l'état de l'écosystème. La pente représente les forces exercées sur elle. Elle peut se trouver dans un état stable (vallée) ou métastable (colline). L'ordonnée représente la valeur de la variable de réponse. Un choc engendre un déplacement de la bille. Si le déplacement impose une force (flèche rouge) dans le sens contraire du déplacement, le système est stable. Si la force engendrée est dans le même sens que le déplacement, le système est instable.

La réponse typique d'un objet résilient en cas de choc sera de s'éloigner de son équilibre avant d'y retourner avec une certaine cinétique. Il est également possible de représenter le plan de phase associé à cette analogie de la bille (Scheffer et al., 2001).



**Figure I.1-2 : Analogie de la bille pour décrire un écosystème (Scheffer et al., 2001)**

Les conditions extérieures affectent la résilience d'écosystèmes présentant plusieurs états stables. Le plan de phase met en évidence des bassins versants. Si un écosystème se trouve soudainement à cause d'un choc à un point quelconque du plan de phase, il se dirige vers l'équilibre le plus proche.

#### b) Pour un système à multiples dimensions

Les systèmes seront dits complexes (ou à multiples dimensions) lorsqu'ils comportent plusieurs objets, et plusieurs variables. Pour un système à multiples dimensions, la stabilité peut être considérée de deux façons :

- 1) toutes les variables restent proches de l'état d'équilibre lors d'un choc.
- 2) Les variables agrégées (qui sont des variables de réponse composées de plusieurs variables) restent proches de leur valeur d'équilibre lors d'un choc, auquel cas le système est stable au sens de Lyapunov. Certaines propriétés ne peuvent émerger que pour des variables agrégées (Steiner et al., 2006). Par exemple, certaines théories suggèrent que les fluctuations au niveau populationnel peuvent stabiliser les variables agrégées telles que la biomasse ou la productivité (Cottingham et al., 2001 , Gonzalez and Descamps-Julien, 2004). Souvent, ces variables agrégées sont plus accessibles expérimentalement (Garnier et al., 2004 , Shipley et al., 2006).

#### c) Définir une échelle d'observation d'espace et de temps pour des systèmes biologiques

Nous avons vu que la définition physique de la stabilité impliquait les réactions du système lorsqu'il s'écarte légèrement de son état d'équilibre. Nous avons également vu qu'il était possible

d'appliquer cette définition à un système comportant plusieurs variables soit en suivant plusieurs variables indicatrices, soit en utilisant une variable agrégée. Nous pouvons donc étudier la résilience soit des populations, soit du flux. Pour les systèmes biologiques, estimer les populations et les flux implique de choisir une échelle de temps et d'espace. Ce problème du changement d'échelle (« scaling up ») est un des défis majeurs de l'écologie (Peterson et al., 1998, Ritchie and Olff, 1999). Il est d'autant plus primordial en écologie microbienne que les mécanismes de base ont lieu à l'échelle du micron alors que la fonction est mesurée à une échelle beaucoup plus grande.

Pour définir un équilibre, l'échelle de temps est arbitraire dans les systèmes biologiques. En effet, une variable peut être à l'équilibre sur une courte période de temps mais dériver lentement sur une échelle plus longue. Comparer des vitesses de résilience en terme de jours de systèmes aux vitesses d'évolution très différentes est peu pertinent. Intuitivement, une population d'insectes aura une réaction au choc rapide par rapport à une population d'éléphants, qui ont un temps de génération plus long. Le retour à l'état initial est défini par rapport à l'échelle de temps d'observation du système. Ainsi, un système qui n'a pas été résilient sur la durée de l'observation peut l'être à plus long terme. A des fins de comparaison, il semble raisonnable de prendre en compte le taux de renouvellement du système en termes d'individus et de substrat. Aussi, nous suggérons de ramener les phénomènes observés au temps de génération moyen du système. Par exemple, pour les chemostats continus, le temps de résidence est un premier indicateur du temps de génération moyen. Ce temps de génération pourrait être l'unité de temps commune à tous les écosystèmes (Shurin et al., 2002).

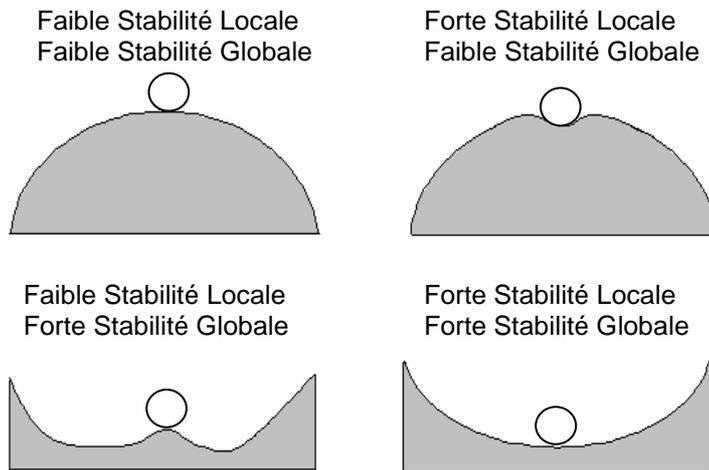
L'échelle d'espace est également un problème en cas de systèmes ouverts (Green et al., 2004, Green and Bohannan, 2006). La vision de l'écosystème « prairie » sera différente selon qu'on observe un mètre carré ou bien plusieurs d'hectares (Kohler et al., 2005). En considérant un système plus large, il est possible que d'autres boucles de régulation entrent en compte. Comme nous le verrons en page 36, les prédateurs et la structuration en réseau trophique peuvent jouer un rôle important dans la résilience. L'échelle d'espace considérée conditionne par conséquent les résultats quant à la résilience car des populations réparties sur diverses échelles d'espace interagissent (Peterson et al., 1998).

### *1.1.1.2. Choc persistant et non persistant.*

Nous avons vu que la résilience qualifie la réponse d'un système à un choc. Ce choc peut être persistant ou non persistant. Bien que la résilience fonctionnelle s'applique et se mesure de la même manière dans les deux cas, ces deux types de chocs font appel à des mécanismes *a priori* différents. Par exemple, il est courant d'évaluer la résilience de la communauté microbienne des sols en appliquant soit un choc thermique transitoire, soit un choc persistant sous la forme de métaux lourds (Griffiths et al., 2000, Griffiths et al., 2005, Kuan et al., 2006, Tobor-Kaplon et al., 2006a, Tobor-Kaplon et al., 2006b). Remarquons ici que le terme de choc persistant ne correspond pas à un temps bien défini. Il s'agit de choc long par rapport à l'échelle d'observation. La résilience à des chocs persistants fait *a priori* appel à une adaptation du système à de nouvelles conditions.

### I.1.1.3. La résilience écologique, aptitude du système à retourner vers le même équilibre

Townsend (Chapitre 22) définit une stabilité locale et une stabilité globale (Figure I.1-3). La stabilité locale exprime la capacité du système à retourner à son état initial après une petite perturbation. La stabilité globale rend compte de la capacité du système à retourner à son état initial après une forte perturbation.



**Figure I.1-3 : Stabilité globale et locale selon Townsend (Begon et al., 1996)**

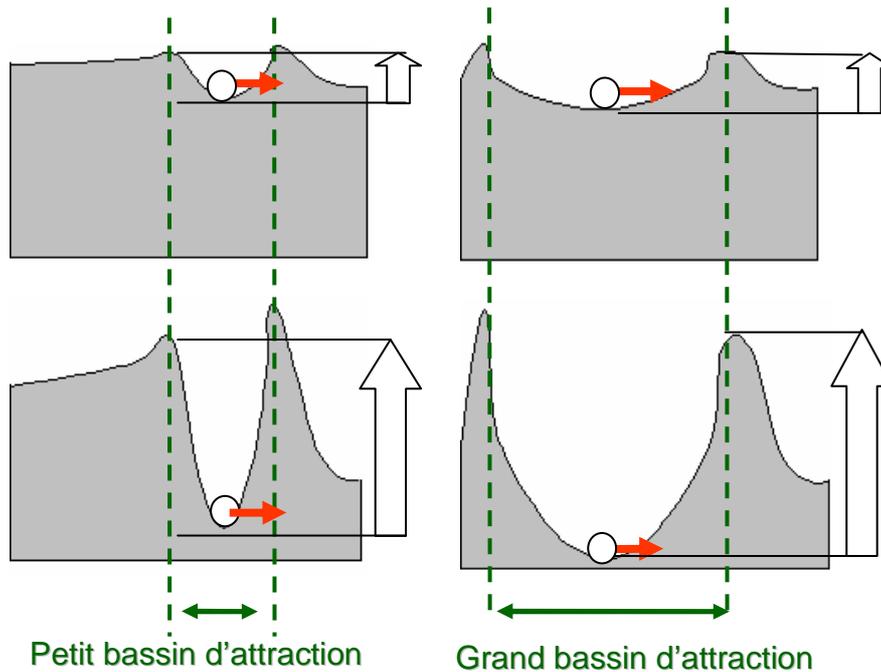
*L'abscisse représente l'état de l'écosystème. Bien qu'un écosystème nécessite plus d'une variable pour être décrit de façon précise, la définition de la résilience se fera dans un premier temps dans une dimension. Ainsi, quatre cas sont possibles, impliquant des stabilités locales ou globales différentes.*

Holling (holling, 1996) définit deux types de résilience en utilisant l'analogie de la bille (Figure I.1-4).

La résilience écologique suppose qu'il y a plusieurs états d'équilibre possibles. Le système est très résilient s'il peut supporter une forte perturbation sans changer d'état. Pour mesurer cette résilience (résilience dite écologique), il est par conséquent logique de quantifier la taille du bassin d'attraction, ou encore la force maximum que peut supporter un système avant de changer d'état.

*(a) Choc maximal que le système peut supporter*

La résilience peut se définir comme l'amplitude maximale que le système peut supporter en conservant le même type de fonctionnement. En reprenant l'analogie mécanique de la bille, cela correspond à l'énergie qu'il faut fournir pour atteindre le haut du puits. Plus le puits est profond, plus le système sera résilient comme l'illustre la Figure I.1-4. Par exemple, Grivan et ses collaborateurs (2005) ont montré que la dégradation de dichlorophénol retourne à son niveau initial après une perturbation pour certains sols mais pas pour d'autres.



**Figure I.1-4 : Schéma de la résilience écologique**

*La gravité attire la bille vers le bas. C'est pourquoi le puits est un état stable. Plus le puits est profond, plus il est stable, car une force doit être très importante pour sortir la bille du puits (les flèches vides représentent l'énergie potentielle nécessaire). La profondeur du bassin représente la force maximale que peut supporter un système sans basculer dans un autre état stable. La largeur du bassin d'attraction représente le changement que le système peut subir sans basculer dans un autre état stable.*

En écologie, ce choc maximal qu'un système peut supporter a parfois été qualifié de résistance. Cependant, en admettant que le déplacement soit proportionnel au choc, le choc maximal qu'un système peut supporter est lié à la variation maximale qu'il peut supporter.

*(b) Variation maximale que le système peut supporter*

La définition physique de la résilience d'un matériau est le changement maximal que ce matériau peut supporter sans excéder son élasticité. La déformation maximale que le système peut supporter est associée à la 'largeur' du bassin d'attraction (Gunderson, 2000, Scheffer et al., 2001). Dans ce cas, ce n'est pas l'amplitude du choc extérieur qui sert à déterminer si un système est écologiquement résilient, mais sa capacité à être modifié et à revenir à l'état initial. Cela correspond donc à la largeur du bassin d'attraction représentée sur la Figure I.1-4. Cette définition présente l'avantage de distinguer deux réponses pour un choc donné : soit l'écosystème varie peu (résistant), soit il varie beaucoup et revient à son équilibre initial (écologiquement résilient).

*(c) Remarque sur la taille du bassin d'attraction*

L'amplitude maximale pour faire sortir la bille n'est pas liée à la largeur mais à la hauteur du bassin. En revanche, la largeur du bassin donne une idée du déplacement de la bille pour une

certaine force de perturbation. Ainsi, l'idée courante de résistance (peu de déplacement lors d'une perturbation) est associée à un bassin raide.

Afin de définir de façon précise cette idée de résistance, les écologues ont défini la résilience d'ingénierie. La résilience d'ingénierie n'est définie que pour des systèmes écologiquement résilients. Elle qualifie la cinétique de retour d'un système après un choc.

Notons enfin que la largeur du bassin représente la *déformation maximale* que peut endurer le système sans se réorganiser autour de processus différents. La définition d'un bassin d'attraction correspond à la stabilité globale ou stabilité d'amplitude au sens de Viera da Silva (1979). : « Si le système peut être éloigné considérablement de son état d'équilibre et être encore capable de retourner à l'état initial, il a une grande amplitude de réponse »

#### *1.1.1.4. La résilience d'ingénierie, cinétique d'un système revenant au même équilibre*

Cette définition de la résilience correspond à une vision d'ingénieur gérant des écosystèmes. Elle suppose que le système reste dans le même fonctionnement global. Rester dans le même fonctionnement global signifie que lorsque la fonction est inhibée par un choc, elle revient à son état initial selon une certaine cinétique. Les mêmes processus ont lieu avant et après le choc. La résilience d'ingénierie caractérise la cinétique de retour de la fonction à son niveau initial.

##### *(a) Temps de retour à la valeur de consigne*

Dans le cas d'une variable de réponse unique, le temps de retour est une façon simple et intuitive de mesurer et de caractériser la résilience. Un temps de retour court correspond à une forte résilience. Cette définition se rapproche de la stabilité élastique au sens de Viera da Silva (1979). C'est une mesure fréquemment utilisée pour quantifier la résilience d'ingénierie (Gunderson, 2000, Hashsham et al., 2000, Cottingham et al., 2004). Pour tester statistiquement le temps de résilience, beaucoup d'auteurs réalisent une ANOVA et observent l'effet du facteur « temps » (Engelhardt and Kadlec, 2001).

Pour les systèmes multidimensionnels, beaucoup d'indices ont été suggérés. Le plus commun est basé sur les valeurs propres de la matrice jacobienne lorsque le système est proche de l'équilibre (Neubert and Caswell, 1997). La matrice jacobienne d'une fonction  $F$  décrivant l'évolution de  $m$  variables  $F=(y_1(x_1, \dots, x_n), \dots, y_m(x_1, \dots, x_n))$  est la matrice des dérivées partielles. L'application de cet indice est possible lorsque des lois mathématiques régissent le modèle. Il est souvent appliqué à des abondances de populations (Upadhyay et al., 2000a, Upadhyay et al., 2000b) dans les modèles théoriques car le temps de retour est gouverné par la valeur propre la plus élevée (Loreau and Behera, 1999). Nous ne détaillerons donc pas cette définition de la résilience qui reste à notre avis plus utile aux écologues théoriciens qu'aux études expérimentales.

##### *(b) Vitesse de retour à la valeur de consigne*

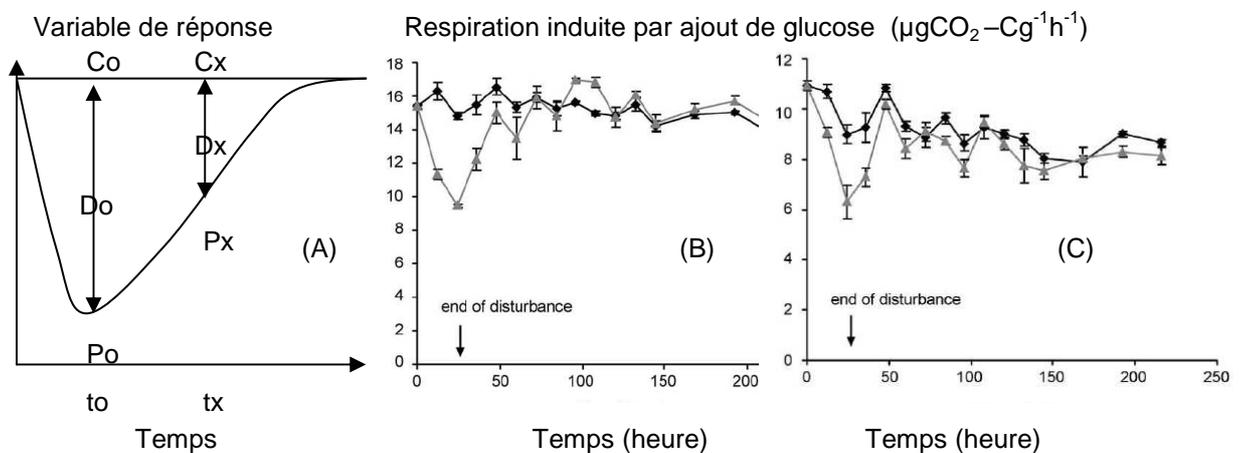
Le temps de retour peut être influencé par la variation instantanée du système. Une bille qui varie peu après un choc aura un temps de retour très court. Il peut donc être plus opportun de mesurer la *vitesse* de retour avec laquelle la variable considérée revient à son état initial. C'est la

définition retenue par Pimm (1984), précurseur des recherches sur la résilience et plus récemment par Steiner (2006).

Cette mesure est facilement accessible, mais ne rend pas entièrement compte de la cinétique de retour d'un système biologique complexe. En effet, le retour peut être linéaire en fonction du temps mais est souvent plus complexe. Certains auteurs ont donc défini d'autres caractéristiques pour caractériser un système qui s'éloigne puis revient à son équilibre initial.

(c) *Indice d'Orwin pour quantifier la résilience*

Un indice adapté aux études expérimentales, basé sur la cinétique de la variable de réponse [agrégée et caractéristique du fonctionnement global] comparée à un contrôle a été proposé (Figure I.1-5) (Orwin and Wardle, 2004). L'indice d'Orwin mesure la résilience par rapport à un contrôle n'ayant pas subi le choc (Équation I.1-3).



**Figure I.1-5 : Temps et valeurs caractéristiques pour une variable de réponse (Orwin and Wardle, 2004)**

La valeur de la variable de réponse varie au cours du temps. A, Pour des systèmes à l'équilibre, la valeur de la variable de réponse dans les témoins est constante au cours du temps (ligne du haut). La variable de réponse dans les systèmes ayant subi un choc s'éloigne de la valeur des témoins puis retourne à l'équilibre ; B, Exemple de la respiration induite par ajout de glucose après un assèchement temporaire pour un sol planté avec du plantain; C, exemple de résilience de la respiration induite par ajout de glucose après un assèchement temporaire pour un sol planté avec du trèfle.

Il est parfois difficile de comparer la résilience de systèmes possédant des résistances différentes (i.e. variation immédiate de la variable de réponse suivant une perturbation). Par exemple, considérons deux sols dont les variables de réponse ont été réduites de 8 et de 2 unités. Si les variables de ces sols ont atteint 70% de leur valeur initiale trois jours après le choc, la vitesse de résilience relative est la même. L'indice d'Orwin sera dans ce cas identique (Orwin and Wardle, 2004).

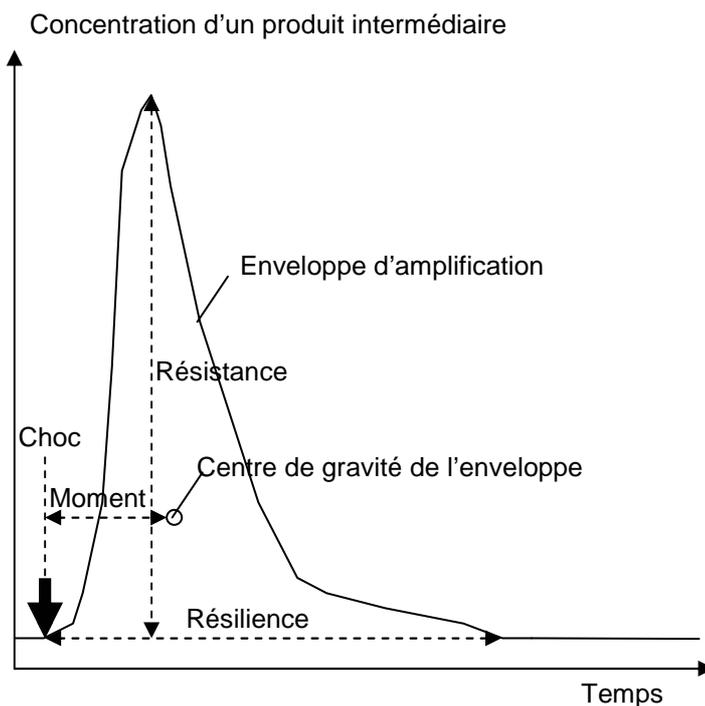
**Équation I.1-3 : indice de résilience d'Orwin**

$$OrwinRL(t) = \frac{2|D_o|}{(|D_o| + |D_t|)} - 1$$

Notons que si la valeur absolue de  $D_x$  est inférieure à la valeur absolue de  $D_o$ , l'indice d'Orwin est compris entre 0 (pas de résilience) et 1 (résilience complète). Si la valeur absolue de  $D_x$  est supérieure à la valeur absolue de  $D_o$ , l'indice est négatif, ce qui correspond à des effets secondaires perturbant la variable de réponse.

*(d) La cinétique de retour à l'équilibre*

Lors d'un choc, la fonction du système se modifie et revient progressivement à la normale. Pour un système monodimensionnel, le suivi de cette variable au cours du temps se nomme l'enveloppe d'amplification. Un certain nombre de points caractéristiques peuvent définir cette enveloppe d'amplification, dont par exemple le temps et la vitesse de retour décrivent cette courbe, mais aussi l'amplitude de réponse et le moment d'amplification (Figure I.1-6). Ces points caractéristiques permettent de comparer les résiliences d'écosystèmes différents.



**Figure I.1-6 : Enveloppe d'amplification d'après Hashsham** (Hashsham et al., 2000)

Hashsham a représenté la concentration au cours du temps d'un produit de dégradation intermédiaire. Lorsque la chaîne de la digestion anaérobie est rompue, la concentration de ce produit intermédiaire augmente jusqu'à un maximum, puis diminue au fur et à mesure que la digestion anaérobie est résiliente. La résilience est mesurée comme le temps de retour à l'état initial. D'autres moments caractéristiques peuvent être définis.

(e) Remarque sur la résistance

La résistance est un concept proche de la résilience. Toutefois, le terme peut avoir plusieurs significations selon les auteurs. Pour les uns, il est le choc maximal qu'un système peut supporter (que nous avons défini comme résilience écologique), pour d'autres, c'est le fait que l'écosystème n'est pas modifié par un choc et pour d'autres encore, c'est la vitesse de retour après un choc (que nous allons définir comme résilience d'ingénierie). Nous reviendrons sur les relations entre résistance et résilience à la page 173.

*1.1.1.5. Stratège « r », stratège « K » et principe de résilience maximum*

Le niveau de sélection écologique pourrait être l'écosystème entier en tant que consortium (Barbault and Blandin). Cette vision de la biocénose préconise de considérer que l'écosystème est plus que la somme de parties qui le constituent. Selon Blandin et al. (1976) ces consortia pourraient suivre des stratégies cénotiques « i » et « S » inspirées des stratégies « r » et « K » élaborées pour des organismes pluricellulaires. Les stratégies « r » et « K » se rapportent à des traits qui ont plus de succès dans certains environnements. Ces deux stratégies se réfèrent à la théorie de biogéographie de MacArthur et Wilson (MacArthur and Wilson, 1967). Cette distinction repose sur l'équation de Verhulst (1838) pour la croissance de populations. Une population d'abondance  $N$  est caractérisée par son coefficient  $r$  et son coefficient  $K$ .

**Équation I.1-4 : Fonction de croissance de Verhulst (1838)**

$$\frac{dN}{dt} = rN\left(1 - \frac{N}{K}\right)$$

*Avec  $r$ , taux de croissance,  $K$ , la capacité biotique et  $N$ , l'abondance de la population*

Les stratégies « r » seraient plus adaptés à un environnement instable et imprévisible, où la capacité de se reproduire rapidement est cruciale. Il y a également relativement peu d'adaptations par rapport aux autres organismes (puisque l'environnement est susceptible de changer). Les traits qui se rapportent à une sélection « r » sont : une forte fécondité, une petite taille, un temps de génération court et la capacité de se disperser. Les stratégies « K » seraient associés à une forte exploitation des ressources limitantes, une grande taille, un long temps de génération et une fécondité moindre. Pour illustrer cette idée, les souris sont des stratégies « r » tandis que les albatros sont des stratégies « K ». Dans les systèmes réels, il y a un continuum entre les stratégies « r » et « K ».

Les stratégies « r » et « K » peuvent être appliquées aux espèces ou bien aux écosystèmes entiers si on considère que l'écosystème (en tant que superorganisme disposant d'un métagénome) est le niveau de sélection écologique. Ainsi, selon la stratégie de l'écosystème, la résilience mettra en jeu des mécanismes différents avec une cinétique différente.

En considérant l'écosystème comme un réseau de flux, certains théoriciens ont avancé que maximiser la fonction revient à maximiser la résilience (Cropp and Gabric, 2002, Kristensen et al., 2003). Ces auteurs ont couplé un système composé de nutriment, de phytoplancton et de zooplancton et un algorithme génétique. Ce système est caractérisé par neuf descripteurs, dont la résilience maximale, qui peuvent être assimilés à la fonction de l'écosystème. Par exemple, on trouve parmi ces

descripteurs la production primaire maximale ou encore la biomasse maximum de phytoplancton. Le système a évolué suivant un algorithme génétique qui modélise la sélection naturelle (mutation aléatoire, crossing-over, succès reproductif lié à la fitness) pour maximiser ces neuf descripteurs. La conclusion de cette étude de modélisation est que les écosystèmes évoluent vers l'état le plus stable possible considérant les contraintes environnementales et leur potentiel génétique (Cropp and Gabric, 2002). Cela suggère que l'écosystème évolue dans le système le plus stable accessible en considérant les contraintes de l'environnement (Steele, 2004). L'état « le plus stable possible » correspond à l'idée de climax en écologie.

La stabilité peut être due à une grande résistance ou à une grande résilience. Pour les écosystèmes de sol, il semblerait que la stabilité soit due à un compromis entre résilience et résistance pour parvenir à la stabilité (Orwin et al., 2006a).

### **1.1.2. Les facteurs favorisant une résilience fonctionnelle forte chez les macro-organismes**

Des études de modèles ou d'écosystèmes réels ont montré que certains écosystèmes étaient plus résilients que d'autres. Ici, nous qualifierons de macro-organisme un organisme eucaryote qui ne peut pas échanger son matériel génétique horizontalement, et qui est généralement multicellulaire. Traditionnellement, le zooplancton en mésocosmes a été beaucoup utilisé pour tester des hypothèses écologiques. Ainsi, la majorité du zooplancton, bien qu'invisible à l'œil nu sera considéré comme macro-organisme.

Nous étudierons dans cette partie les facteurs qui augmentent la résilience, qu'elle soit considérée comme résilience écologique ou comme résilience d'ingénierie. Pour éviter toute confusion, nous précisons le type de résilience considéré. Nous étudierons d'abord les systèmes réagissant par une adaptation physiologique de chaque individu le composant puis les systèmes réagissant par un changement d'espèces.

#### *1.1.2.1. Les communautés fortement résilientes peuvent réagir par un changement physiologique*

Le choc peut induire une diminution temporaire de l'efficacité d'un système à cause d'une réaction physiologique de chaque organisme. Dans ce cas, la résilience du système est due à la tolérance individuelle de chaque organisme. Ce choc peut être absorbé par chaque individu. Il s'agit avant tout d'une réaction d'ordre physiologique. Ce sont les mêmes organismes avant et après le choc. Dans ce cas, la résilience à un choc est due à la tolérance des espèces présentes. (Ives et al., 2000)

Fischer et al. (2001) ont observé le zooplancton de trois zones de lac ayant subi ou non une acidification dans les années 80. En étudiant la réponse du zooplancton dans des mésocosmes acidifiés, il a montré que l'acidification a induit un changement de la réaction du zooplancton en cas de nouvelle exposition à un choc acide. Ainsi, des fluctuations environnementales peuvent engendrer une plus grande tolérance des organismes. Cette tolérance peut être due à une adaptabilité de la physiologie des organismes en milieu perturbé (Atlas et al., 1991).

### *1.1.2.2. Les communautés fortement résilientes peuvent réagir par un changement de structure*

#### a) La diversité en tant que richesse spécifique

Dans le cas où une fonction particulière est assurée par une seule espèce, la résilience de la fonction est liée à la résilience de l'espèce. Si plusieurs espèces assurent une même fonction, la résilience fonctionnelle peut être due, soit à la résilience de chaque espèce à son niveau d'activité initiale, soit à la compensation par un niveau d'activité supérieure de certaines espèces. Nous détaillons ici le premier cas.

Le retour de chaque population à son activité initiale est la situation qui se rapproche le plus des modèles théoriques qui s'intéressent à la résilience de chaque population. Ces modèles théoriques analysent les valeurs propres d'un système pour définir son aptitude à revenir à l'état initial en cas de choc. Les travaux de May (1973) font figure de référence dans ce cadre. Par des réseaux de Lotka-Volterra générés aléatoirement, il montre que la résilience d'ingénierie serait défavorisée par la diversité (Pimm, 1979b, Pimm, 1979a, May, 1981)

#### b) Les communautés aux organismes diversifiés

Depuis longtemps, la diversité a été associée à la résilience fonctionnelle en cas de choc. Cela est principalement dû à l'idée que plus un système est diversifié, plus la probabilité qu'il contienne une espèce réagissant rapidement en cas de choc est élevée. C'est le mécanisme de « sampling » ou « selection ». Notons que la résilience d'une variable agrégée ne nécessite pas la résilience de chaque population (Tilman et al., 1997). Par exemple, pour la variable « assimilation du carbone », un choc peut provoquer la disparition d'une population au profit d'organismes différents mais qui assimilent la même quantité de carbone dans leur ensemble. On aura alors une résilience fonctionnelle mais pas populationnelle.

De nombreuses études portant sur la relation diversité – stabilité prennent en compte la diversité en tant que « richesse spécifique ». Ces études sont souvent centrées sur la question suivante : comment la perte d'espèces influence-t-elle le fonctionnement de l'écosystème. Les résultats ne tranchent pas clairement en faveur d'une action positive de la richesse sur la résilience : Bien que certaines études montrent que des prairies plus diverses (i.e. comportant plus d'espèces) sont plus résilientes (Tilman and Downing, 1994, Hooper et al., 2005), d'autres études montrent que la résilience est indépendante de la richesse. Par exemple, 220 mésocosmes inoculés avec un nombre variable de plantes aquatiques ont montré que la résilience était indépendante de la richesse (Engelhardt and Kadlec, 2001).

En conclusion, l'effet de la diversité (richesse spécifique) sur la stabilité (résilience d'ingénierie) d'une variable agrégée n'est pas clair. En particulier, certains arguments laissent à penser que la stabilité (résilience d'ingénierie) diminue avec la diversité. La relation entre diversité et stabilité a été d'abord étudiée dans des modèles à un niveau trophique (i.e. des herbivores sans prédateurs par exemple), dans le but de simplifier le problème (car il n'y a pas d'interactions complexes de type boucle de régulation). Ces modèles à un niveau trophique suggèrent que la

résilience d'ingénierie peut diminuer, être maximale pour des valeurs intermédiaires ou ne montrer aucune relation avec la diversité (Loreau and Behera, 1999).

De fait, la résilience semble être indépendante de la diversité lorsque des espèces différentes peuvent jouer le même rôle (redondance fonctionnelle). La relation diversité – stabilité est toujours débattue. Un des éléments qui rend cette relation floue est la redondance fonctionnelle. En effet, les organismes sont organisés en réseaux trophiques, et l'ajout d'une espèce à un niveau trophique en comportant beaucoup n'a pas le même effet que l'ajout d'une espèce à un niveau trophique de faible richesse spécifique. Pour illustrer cette idée, dans une prairie pleine de vaches, ajouter un mouton ne modifiera pas *a priori* le fonctionnement de l'écosystème. En revanche, ajouter un lion modifiera certainement l'équilibre de la prairie. Raisonner uniquement en termes de diversité sans prendre en compte la redondance fonctionnelle a donc peu de chance d'aboutir à des résultats cohérents. Nous allons détailler le cadre conceptuel de cette idée dans le paragraphe suivant.

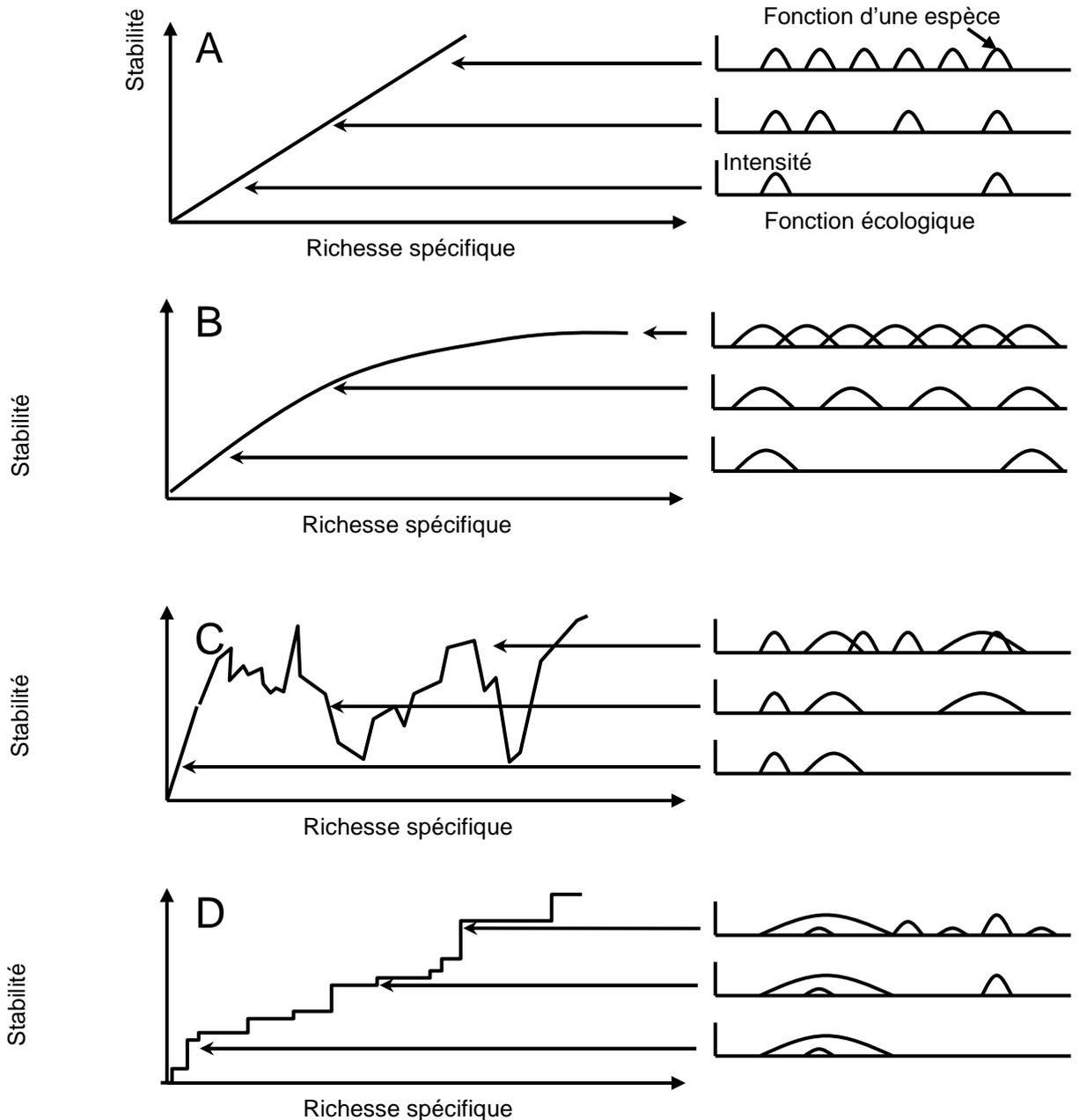
### c) Une plus grande richesse spécifique favorise une forte redondance fonctionnelle

La diversité en termes de nombre d'espèces n'a pas beaucoup de sens en tant que tel. Une première difficulté des raisonnements en termes de diversité est de ne pas prendre en compte la redondance fonctionnelle.

Bien que plus d'espèces impliquent plus de « fonctions », la redondance fonctionnelle au sein de l'écosystème dépend de l'organisation écologique de ces espèces (Peterson et al., 1998). Pour en donner un exemple, ajouter une espèce supplémentaire d'herbivore a moins de chance d'influer sur le fonctionnement d'une prairie que d'ajouter un prédateur.

Notons enfin que le nombre d'espèces et la stabilité (en tant que variable constante dans le temps) dépend de l'organisation écologique du système Figure I.1-7.

En conclusion, une richesse spécifique plus importante engendre une redondance fonctionnelle plus importante, mais l'augmentation de la richesse n'augmente pas forcément la redondance fonctionnelle de manière proportionnelle.



**Figure I.1-7 : Modèles d'organisation écologique d'après Peterson et al. (1998)**

L'abscisse du diagramme représente la richesse spécifique (nombre d'espèces) et l'ordonnée représente la stabilité de la fonction, dans les inserts, la diversité de la fonction écologique est traduite par une courbe large, et l'importance dans le fonctionnement est traduite par une courbe haute ; A, Le modèle de Darwin/ Mac Arthur où les espèces s'accumulent remplissent les niches écologiques sans les saturer ; B, Le modèle « rivet » où il y a redondance fonctionnelle lorsque la richesse spécifique est grande ; C, le modèle idiosyncrasique considère que la fonction dépend beaucoup de l'interaction entre les espèces ; D, le modèle des « conducteurs » et des « passagers » suggère que certaines espèces sont déterminent le fonctionnement de l'écosystème tandis que d'autres sont seulement des « passagers ».

d) Une forte redondance fonctionnelle des organismes favorise une forte résilience

Lorsque de nombreux organismes sont présents dans une même niche et assurent la même fonction, la redondance fonctionnelle est forte (Naeem and Li, 1997). La redondance fonctionnelle est d'autant plus forte que plusieurs espèces différentes sont capables d'assurer la même fonction. Cela a un effet sur la résilience écologique et sur la résilience d'ingénierie.

La redondance fonctionnelle est liée à la résilience écologique. En effet, lorsque certaines espèces ne sont pas remplaçables, leur extinction a des conséquences très importantes. Ces espèces, dont l'abondance relative peut être faible, sont appelées espèces clés (« keystone »). Ces espèces clés assurent souvent seules la fonction d'un écosystème.

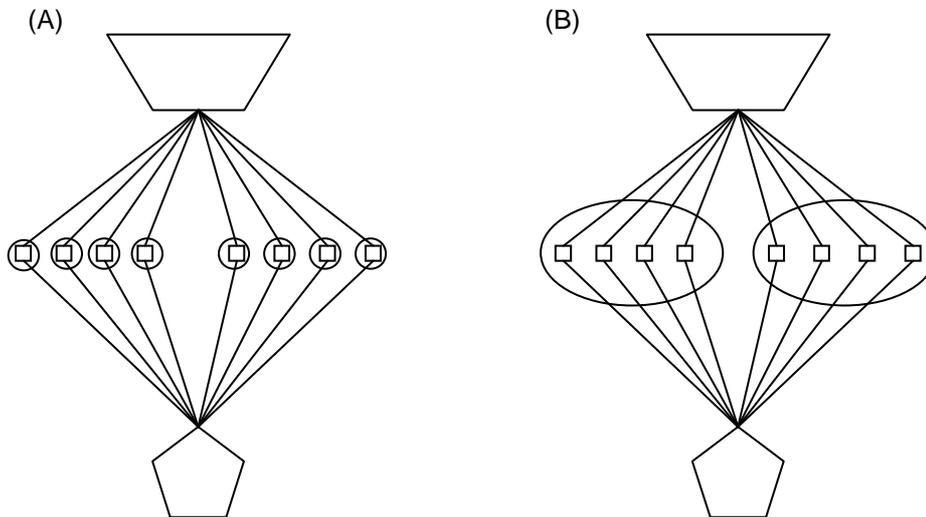
Elles ont été classées en espèces prédatrices, herbivores, mutualistes ou intervenant dans un processus biogéochimique (Schulze and Mooney, 1994). Pour illustrer cette idée, l'enlèvement d'un prédateur clé modifie l'abondance de ses proies, qui peuvent de ce fait entrer en compétition intense. Par exemple, la loutre de mer consomme des oursins qui consomment eux-mêmes des algues de varech *Laminaria* et *Agarum*. En l'absence de loutres, les oursins deviennent très abondants, créant des aires sans varech et sans les espèces qui lui sont associées. L'abondance relative des algues du varech dépend des oursins qui consomment préférentiellement *Laminaria* et l'abondance des oursins dépend des loutres. Ainsi la loutre est une espèce clé, car son évolution conditionne l'évolution de beaucoup d'espèces (Schulze and Mooney, 1994). Si la loutre vient à disparaître et qu'elle est l'unique prédateur de l'oursin, le fonctionnement de l'écosystème n'est pas résilient. Par conséquent, une redondance fonctionnelle faible engendre une résilience écologique faible. La disparition de ces espèces clés peuvent avoir des conséquences extrêmement importantes sur l'ensemble des chaînes trophiques (Mittelbach et al., 1995, Lyons et al., 2005, Quince et al., 2005).

Certaines espèces clés semblent jouer un rôle prépondérant dans la résilience (Engelhardt and Kadlec, 2001). Par exemple, la résilience de communautés de macroalgues intertidales dont la diversité (composition et richesse spécifique) a été manipulée dépend plus de la composition spécifique que du nombre d'espèces en cas de choc thermique (Allison, 2004).

La redondance fonctionnelle est également liée à la résilience d'ingénierie. Une étude portant sur les microarthropodes du sol montre que ceux-ci ont une forte redondance fonctionnelle par rapport à la croissance de la plante (Liiri et al., 2002). Les auteurs ont réalisé des microcosmes comportant entre une et dix espèces de microarthropodes. Ils ont ensuite appliqué une sécheresse et observé que la résilience d'ingénierie de la communauté arthropode ne dépendait pas de la richesse spécifique initiale.

En 1955, MacArthur (1955) avançait l'idée suivante: si plusieurs flux coexistent dans un système, il est improbable que l'abondance d'une population change en réponse au changement anormal d'une autre population. En 1982, Pimm montre que la stabilité fonctionnelle d'un système dépend de la « connectance » (parfois également traduit sous le terme de « connectivité) du réseau trophique. Cette stabilité fonctionnelle est liée à la loi de diversité requise. Nous empruntons l'analyse de Frontier à ce sujet en considérant l'écosystème comme un flux d'énergie trophique (Frontier):

« Ce flux se ramifie en passant par des niveaux trophiques successifs. L'entropie mesure la quantité de choix (ou diversité) du cheminement d'énergie. Il existe en cybernétique une loi de diversité requise établissant que, pour réguler un système qui a subi une perturbation, il faut que le canal responsable de l'information en retour ait une capacité au moins égale à la quantité d'information apportée par la perturbation. »



**Figure 1.1-8 : schéma de flux redondants au niveau des espèces (A) et au niveau des voies métaboliques au sein d'individus (B)**

*Pour transiter d'un lieu à un autre, le flux de matière et/ou d'énergie peut emprunter des voies parallèles. Ces voies parallèles peuvent être contenues dans un organisme (diversité métabolique) ou dans plusieurs espèces différentes (voies parallèles du réseau trophique).*

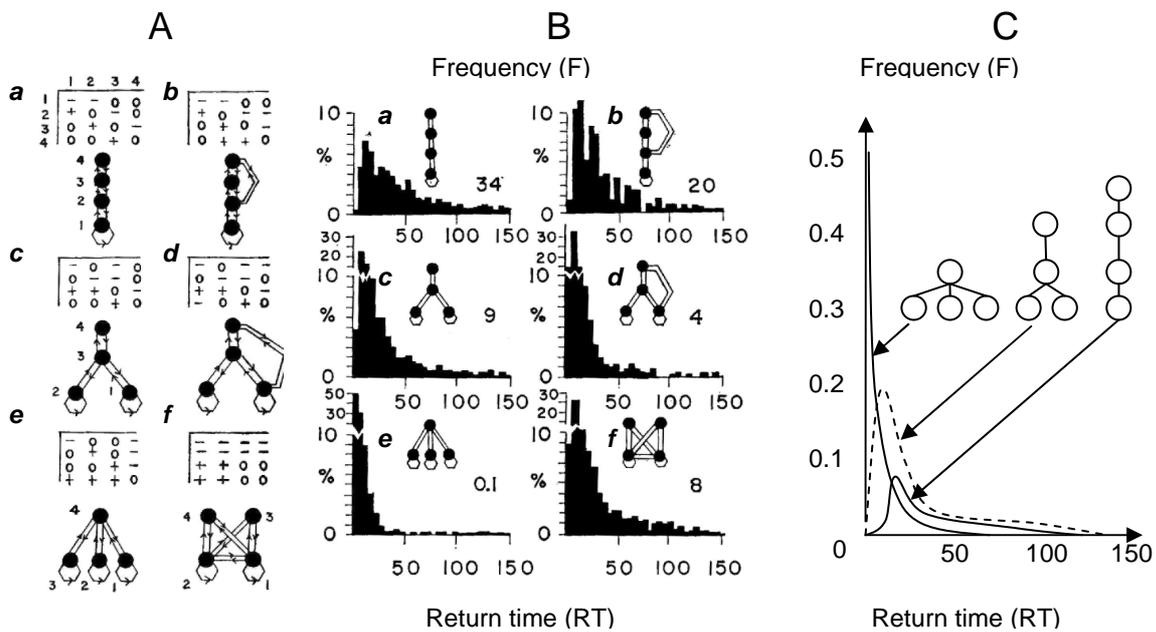
L'idée des flux redondants est que, si une perturbation élimine une espèce assurant le passage d'énergie, les flux parallèles (donc redondants) absorberont rapidement l'énergie qui ne pourra plus s'évacuer par le flux disparu. Ainsi, le flux total aura une forte résilience fonctionnelle.

Un tel réseau présente des propriétés intéressantes d'un point de vue théorique. Cependant les conclusions que l'on peut en tirer seront toujours assujetties au caractère simpliste de sa construction. En effet, dans des systèmes réels, les individus sont connectés à plus d'une autre espèce. L'écologie s'est donc rapidement intéressée à l'effet de la connectance sur la stabilité des populations (qui est liée à la résilience fonctionnelle car dans ce cas théorique si les populations sont résilientes, alors la fonction est résiliente).

En conclusion, la redondance fonctionnelle se traduit en termes de flux global par une diversité des cheminements possibles de l'énergie. Si une des voies venait à ne plus fonctionner, l'énergie passant par cette voie peut se redistribuer rapidement dans les autres. Ainsi la redondance fonctionnelle assure une forte résilience.

e) L'organisation en chaîne trophique

Certaines études ont attiré l'attention sur le rôle de la chaîne trophique sur la résilience (DeAngelis et al., 1989). Des simulations ont montré que le temps de retour après une perturbation est plus court pour quatre espèces si elles sont réparties en deux niveaux trophiques au lieu de former un réseau à quatre niveaux (Figure I.1-9), confirmant par là même l'importance de la longueur de la chaîne trophique sur le temps de retour (Pimm and Lawton, 1977). Carpenter et al. (1992) ont étudié les flux de phosphore dans des lacs avec ou sans poissons piscivores qui consomment le zooplancton : le flux de phosphore est plus résilient (résilience d'ingénierie) lorsque la chaîne trophique est plus courte.



**Figure I.1-9 : Fréquence des temps de retour pour des réseaux à deux, trois ou quatre niveaux trophiques (Pimm and Lawton, 1977), synthétisé par Townsend**

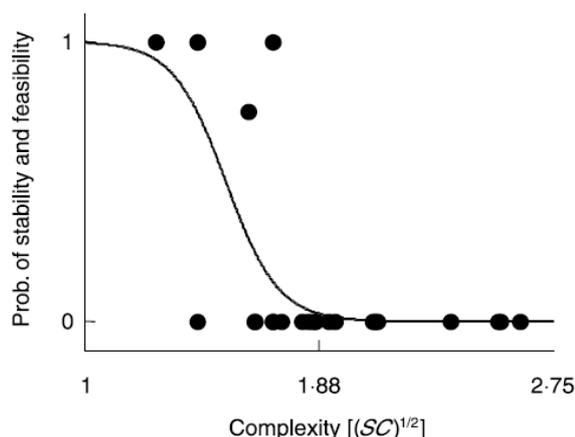
A, la matrice décrit les interactions positives (+) et négatives (-) ou nulles (0) entre espèces, le schéma représente ces relations sous forme de diagramme, a,b,c,d,e,f représentent différentes configurations de la chaîne trophique ; B, la réciproque de la plus grande valeur propre (mesure de la résilience correspondant au temps de retour à l'état initial) de 2000 matrices de chaque configuration a,b,c,d,e,f représentent différentes configurations de la chaîne trophique ; C, synthèse de la probabilité du temps de retour selon la configuration du réseau trophique (Townsend).

Certains auteurs soulignent cependant que dans les travaux de Pimm et Lawton (1977), le temps de retour plus court peut en partie être dû à l'augmentation du nombre de liaisons entre les niveaux (Townsend). La stabilité décroissante observée dans le modèle de Pimm et Lawton pourrait donc être due à un autre facteur que la longueur de la chaîne. En outre, des effets secondaires font que l'hypothèse de la stabilité décroissante des chaînes trophiques longues est remise en question (Stern et al., 1997). De plus, d'autres facteurs que la longueur de la chaîne trophique peuvent intervenir.

Pour estimer l'impact de la chaîne trophique sur la réaction en cas de choc, Cottingham a étudié la réponse du phytoplancton contrôlé par différentes communautés de zooplancton. Dans ce système, le phytoplancton est consommé par du zooplancton. La structure de la communauté zooplanctonique a été préalablement modifiée en introduisant des poissons planctonivores. Cottingham *et al.* (Cottingham and Schindler, 2000, Cottingham et al., 2004) ont observé la réponse de ces systèmes en cas d'apports ponctuels (« pulse ») de nutriments. Le phytoplancton contrôlé par un zooplancton de grande taille a un temps de retour plus important. Par conséquent, le nombre de niveaux trophiques (i.e. longueur de la chaîne) influence la résilience, mais le type d'organisme (zooplancton de grande ou de petite taille) du niveau trophique supérieur est également important. En plus de la composition en prédateur, la diversité de cheminement du flux est cruciale.

Dans les modèles théoriques de May qui assemblent aléatoirement des populations, trois paramètres ont été reliés à la stabilité :  $\beta$ , la force d'interaction moyenne ; S, le nombre d'espèces et C, la connectance (ou connectivité). La connectivité est liée au fait que certaines espèces de l'écosystème interagissent alors que d'autres s'ignorent. Par exemple, les anémones et les poissons qui vivent dans les anémones interagissent fortement entre eux, ils sont relativement indépendants des requins. La connectance, qui caractérise l'ensemble du réseau trophique, peut être pertinente par rapport au nombre d'espèces (Frontier). De façon contre intuitive, la connectance peut diminuer alors que le nombre d'espèce augmente (Rejmanek and Stary, 1979).

May a déterminé qu'un système complexe serait résilient au niveau populationnel (toutes les espèces regagnent leur niveau initial après une perturbation) si  $\beta.(SC)^{1/2} < 1$ . En d'autres termes, augmenter le nombre d'espèce, la connectance et la force d'interaction rendraient le système instable (i.e. non résilient) au niveau populationnel. Certaines données expérimentales basées sur des microcosmes comportant des bactéries, des protistes et des métazoaires (Fox and McGrady-Steed, 2002) semblent confirmer cette hypothèse (Figure I.1-10).



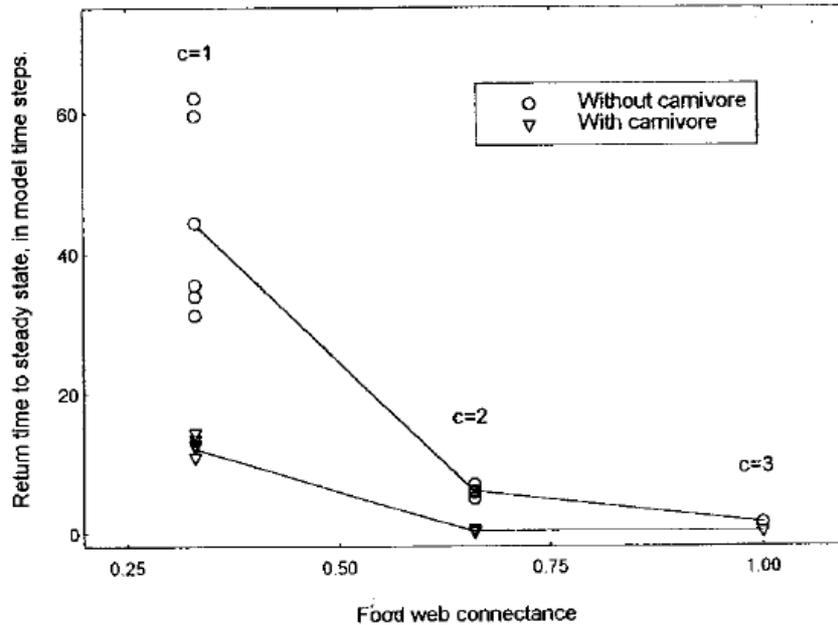
**Figure I.1-10 : Probabilité de stabilité en fonction de la complexité dans des microcosmes aquatiques (Fox and McGrady-Steed, 2002)**

Notons qu'un système résilient au niveau populationnel est supposé résilient au niveau fonctionnel, alors que la réciproque n'est pas vraie.

Cependant, ces études théoriques s'appuient parfois de par leur construction sur des hypothèses n'ayant pas de signification biologique. Par exemple, dans le système théorique de May

évoqué plus haut, il est possible de trouver des prédateurs sans proie (Townsend). De plus, bien qu'en considérant l'ensemble des systèmes générés, la stabilité diminue avec la connectance, si on considère uniquement les communautés stables (qui reviennent à leurs niveaux de populations initiales), le temps de retour diminue avec la connectance. La résilience d'ingénierie est donc favorisée par des chaînes « simples » (Pimm, 1982).

De plus, certains arguments laissent à penser que la connectance ET la présence de prédateurs agissent sur la résilience fonctionnelle [en tant que temps de retour à l'état initial]. Par exemple, l'étude de Harding (2001) montre que dans le système théorique de « daisyworld » la relation entre temps de retour et connectance dépend de la présence de prédateurs.



**Figure I.1-11 : Modification de la relation temps de retour- connectance par les prédateurs**

*Dans un modèle théorique, la résilience après une augmentation de l'énergie solaire de 5% dépend de la présence de carnivores.*

Des études récentes comparant des écosystèmes théoriques et des écosystèmes réels ont montré que l'asymétrie des interactions pourrait également modifier la stabilité (DeWoody et al., 2003 , Rooney et al., 2006). Il semblerait donc que le type d'interactions soit un composant majeur de la résilience d'ingénierie d'une chaîne trophique.

f) Le contrôle par prédation ou par disponibilité de nutriments

Une étude théorique prédit que les réactions en cas de variation de productivité ou d'entrée de matière organique dans un système dépendent du type de régulation des populations (« bottom-up » ou « top-down ») (Ginzburg and Akaçakaya, 1992).

g) L'hypothèse des perturbations intermédiaires

L'hypothèse des perturbations intermédiaires stipule que la biodiversité est maximale lorsque les perturbations ne sont ni trop rares ni trop fréquentes. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe

b), les liens entre richesse spécifique et résilience sont complexes. Cependant, les fluctuations environnementales et les contraintes dynamiques pourraient sélectionner des propriétés de la communauté indépendamment de la diversité (Fox and McGrady-Steed, 2002).

### *1.1.2.3. Les facteurs favorisant un retour rapide après un choc quelle que soit la communauté*

Un certain nombre de facteurs semblent favoriser la résilience d'ingénierie, que le système réagisse à un niveau physiologique ou structurel. Il s'agit de l'apport d'énergie rapporté à la masse, de l'importance du flux d'énergie et de nutriments et de l'hétérogénéité de l'environnement.

#### a) Importance du flux d'énergie et de nutriments

Plus l'apport d'énergie par unité de masse sera important, plus la probabilité d'une résilience rapide est élevée (O'Neill, 1976). En d'autres termes, plus le flux est important, plus l'effet du choc sera « dilué » rapidement. L'influence de la productivité sur la résilience a été relativement peu étudiée. Historiquement, les premières études théoriques suggèrent que la productivité favorise la résilience fonctionnelle (Moore et al., 1993a). D'autres études postérieures relativisent cette relation car elle dépend fortement de la structure du modèle (Stone et al., 1996, Xu and Li, 2002).

#### b) Environnement hétérogène

Dans l'environnement, la résilience d'un espace est conditionnée par les échanges avec le milieu environnant. Nous verrons ce point plus en détail avec le modèle neutre de Hubbell (2001) qui considère que la diversité locale est assujettie à la diversité de la métacommunauté environnante. Par exemple, des réserves sont instaurées afin de permettre la recolonisation du milieu environnant après un choc. La faune et la flore peuvent ainsi recoloniser un espace soumis au choc. La résilience structurelle et fonctionnelle de cet espace ne dépend donc pas uniquement de ses qualités intrinsèques, mais aussi de l'hétérogénéité de l'environnement.

### **1.1.3. Conclusion sur les théories se rapportant à la résilience fonctionnelle et sur les observations de macro-systèmes**

Beaucoup d'événements peuvent en théorie modifier la résilience fonctionnelle, que ce soit en agissant sur la diversité des voies métaboliques au sein des individus ou au sein des réseaux trophiques. L'effet de certains de ces événements a pu être vérifié expérimentalement, démontrant l'effet de l'histoire de l'écosystème (Fukami, 2001). Cependant, beaucoup de vérifications ont été réalisées sur des assemblages artificiels de quelques espèces en mésocosmes. Ces modèles sont donc limités pour étudier le rôle de la diversité environnementale des voies métaboliques individuelles ou des réseaux trophiques sur la résilience fonctionnelle. Pour étudier la résilience de systèmes réels comportant un grand nombre d'espèces, l'écologie microbienne est privilégiée.

## **I.2. La résilience fonctionnelle des écosystèmes microbiens**

Nous avons vu dans la partie précédente que les écologues s'intéressent de près à la résilience des écosystèmes mais que tester leurs hypothèses s'avère difficile. En effet, il est difficile d'étudier un système qui est soumis à des échanges avec l'extérieur et dont la vitesse d'évolution est très longue. Les microbiologistes sont aujourd'hui dans une position privilégiée pour tester des hypothèses émises par les écologues car ils peuvent étudier des systèmes modèles ne présentant pas ces inconvénients. Toutefois, les écosystèmes microbiens sont particuliers à plusieurs points de vue que nous allons développer. Si cela ne leur ôte pas leur aptitude à être des modèles de qualité, il faut néanmoins extrapoler les résultats obtenus avec précaution.

### **I.2.1. Les particularités des écosystèmes microbiens**

#### *I.2.1.1. Le consortium microbien, niveau d'intégration plus pertinent que l'espèce*

Pour les macro-organismes, l'espèce est définie d'une manière générale par des traits de vie particuliers, des phénotypes stables, la possibilité d'échanger du matériel génétique et d'engendrer une descendance. Cette définition n'est pas applicable en l'état aux micro-organismes dont les traits de vie restent un mystère, dont les phénotypes sont plastiques et difficilement observables et qui peuvent incorporer une séquence d'ADN par transfert horizontal. Cette séquence d'ADN peut être incorporée par transformation à partir d'une séquence présente dans le milieu (de Vries and Wackernagel, 2004, Ceremonie et al., 2006), par transduction à partir d'un bactériophage (Mann et al., 2003) ou par conjugaison à partir d'une autre bactérie (Paul, 1999), qui appartient à une espèce différente.

L'échelle de sélection écologique pourrait donc être non pas l'espèce, qui est une notion floue, mais le système dans son ensemble, c'est-à-dire avec toutes ses interactions, où l'évolution de chaque individu dépend de l'évolution du groupe. Ainsi, le niveau de sélection écologique serait l'écosystème. Si cela est vérifié, il devient alors possible de définir des stratégies pour le consortium bactérien, à l'instar des stratégies définies pour les biocénoses (Barbault and Blandin).

#### *I.2.1.2. Des moyens d'études pour étudier ces consortia microbiens particuliers*

Certaines techniques sont particulièrement adaptées pour étudier les écosystèmes microbiens en tant que consortia parce ce qu'elles caractérisent la totalité du consortium avec un minimum d'idée préconçue.

##### a) Dédire l'abondance de populations par la présence de gènes caractéristiques

Pour déterminer la structure d'un système composé de plusieurs populations microbiennes, il est possible d'extraire l'ADN et de quantifier l'abondance de séquences géniques caractéristiques de certaines populations. Si le gène est présent dans tous les micro-organismes observés, on pourra alors parler de marqueur « universel ». Cette technique reste très utilisée pour caractériser les communautés microbiennes. Plusieurs régions peuvent servir de marqueurs (par exemple, le gène

*rpoB* (Dahllof et al., 2000, Walsh et al., 2004 )) ou le gène 5S ADNr (Casamayor et al., 2000) mais le gène de l'ADNr 16S est le plus communément employé (Kemp and Aller, 2004). Dans le cas du gène ADNr 16S, plusieurs zones peuvent être utilisées. Ces régions peuvent fournir des images légèrement différentes de la diversité (King et al., 2005). Il est également possible d'utiliser la région intergénique entre le gène 16S et le 23S (Jensen and Straus, 1993, Dolzani et al., 1994 , Garcia-Martinez et al., 1999 , Brown et al., 2005). Notons qu'une technique basée sur la composition des lipides fondée sur des séquences suit la même approche (Singh et al., 2006). Ces techniques sont particulièrement adaptées pour étudier des systèmes microbiens en tant que consortia car elles caractérisent les communautés dans leur ensemble.

#### b) L'approche méta génomique et méta protéique

Les consortia bactériens peuvent être imaginés comme des organismes dont les cellules interagissent mais ne sont pas reliées physiquement. Il paraît donc possible d'étudier l'ensemble de gènes ou l'ensemble de protéines exprimées présent sans tenir compte de membranes séparant chaque génome individuel, ce qui est un défi pour la biologie (Goldenfeld and Woese, 2007). Une solution possible est de séquencer aléatoirement un grand nombre de gènes (Rondon et al., 2000, Breitbart et al., 2003 , Knietzsch et al., 2003, Liles et al., 2003, Sebat et al., 2003, Venter et al., 2004, Noguchi et al., 2006, Pedros-Alio, 2006, Whitaker and Banfield, 2006). Ce travail de métagénomique ou de métagénomique est en pleine expansion. Son atout majeur est de travailler sans sélection préalable des gènes/protéines séquencées (pas d'étape de PCR).

Cependant la quantité d'informations générée par ces approches sans *a priori* engendre des difficultés de traitement (Chen and Pachter, 2005). C'est pourquoi les gènes fonctionnels peuvent faire l'objet d'une attention particulière (Johnston et al., 2005, Sharma et al., 2006). Des techniques comme les puces à ADN se développent pour étudier l'expression de ces gènes au cours du temps (Zhou and Thompson, 2002, Loy et al., 2005, Gentry et al., 2006). L'objectif de ces techniques repose toujours sur une caractérisation globale de l'écosystème.

#### c) La diversité de cheminement du flux

Si on considère l'écosystème comme un flux de matière, le cheminement du flux dépend du nombre de noeuds. Ainsi, pour le flux de carbone, il est pertinent d'utiliser un gène universel comme nous l'avons vu précédemment, car tous les organismes participent à ce flux.

Dans le cas d'un flux d'azote, ou d'un composé toxique quelconque, tous les micro-organismes ne sont pas impliqués. Il est cependant intéressant de déterminer combien de cheminements sont possibles pour ce composé. Dans ce cas, il est très pertinent d'observer la communauté microbienne à l'aide des enzymes participant à la dégradation. En effet, ces enzymes révèlent la diversité potentielle des voies de dégradation du composé. Par exemple, les gènes liés à la fixation de l'azote (Nitrogen fixation, *nif*) sont souvent utilisés (Zehr et al., 1995, Wawer et al., 1997, Burns et al., 2002 , Johnston et al., 2005 , Izquierdo and Nusslein, 2006, Wertz et al., 2006 ). De même, la diversité des enzymes nécessaires à la synthèse de méthane peut être étudiée par la

diversité de *mcrA* (Juottonen et al., 2005), *pmoA* ou *mxnF* (Fjellbirkeland et al., 2001). Pour la dégradation du toluène, le gène *tmoA* peut être observé (Hendrickx et al., 2006).

De plus, la seule présence du gène n'implique pas obligatoirement la présence d'une protéine active dans la cellule (régulation de la transcription, et traduction de l'activité de la protéine). Ainsi, pour certaines fonctions, il est possible de considérer la diversité de la communauté active en caractérisant la divergence des gènes impliqués. Dans le cas d'un séquençage de gènes présents dans l'environnement, cela donne une information sur la diversité *potentielle* du cheminement d'énergie.

Certaines améliorations techniques, comme la SIP (Stable Isotope Probing), ont été récemment mises au point dans le but d'étudier la diversité *réelle* du cheminement. Le principe de la SIP repose sur le suivi de carbone marqué incorporé aux cellules. Ce suivi est possible car un neutron supplémentaire rend le carbone marqué plus lourd (isotope lourd). L'ADN synthétisé à partir de ce carbone est plus dense et peut donc être séparé de l'ADN des micro-organismes n'incorporant pas de carbone marqué par gradient de densité. Le séquençage permet ensuite de déterminer l'identité des organismes qui ont assimilé ce carbone marqué (Manefield et al., 2002).

#### d) Exécution d'une fonction macroscopique

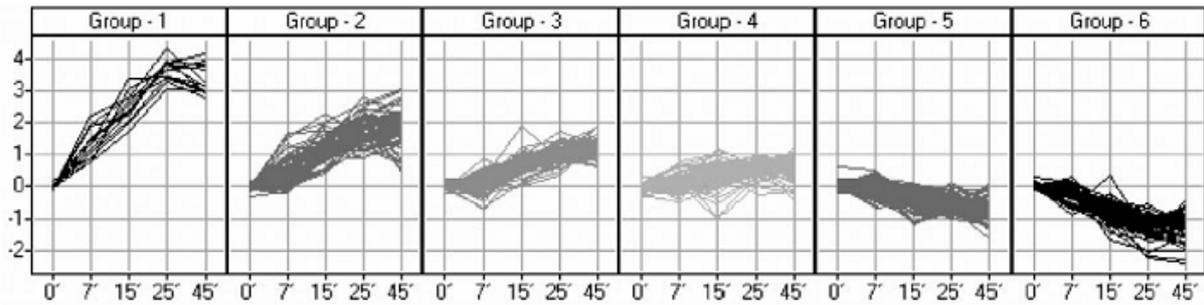
Souvent, l'intérêt du consortium microbien réside dans une fonction particulière utile à l'homme. Il est donc logique de se servir de cette fonction observable à échelle humaine pour caractériser le consortium. Il peut s'agir de minéralisation, de sources de carbone simples (Degens et al., 2001, Nakatsu et al., 2005), de la dégradation de composés toxiques (Girvan et al., 2005, Manefield et al., 2005), de matière organique dissoute (Bernard et al., 2000, Malmstrom et al., 2005), de matière organique adsorbée sur des particules (Nagata and Kirchman, 1996) ou de résidus de plantes solides (Griffiths et al., 2000, Griffiths et al., 2004)

### **1.2.2. La réaction des écosystèmes microbiens à un choc majeur**

#### *1.2.2.1. Réaction impliquant un changement physiologique*

A l'instar du premier mécanisme vu pour les macro systèmes, la résilience d'un système microbien peut être due à la reprise d'une activité métabolique des micro-organismes. Par exemple, les protéines SOS exprimées lors d'un stress permettent une plus grande résistance.

Comme l'ont suggéré des études théoriques (Richmond et al., 2005), la tolérance des espèces à un choc est un élément clé de la résilience. Cette tolérance peut impliquer une réponse physiologique très rapide. La tolérance peut jouer un rôle majeur dans le cas des bactéries pathogènes (pour revue, (Lewis, 2007)). Par exemple, lorsqu'il est soumis à une température de 40°C *Xylella fastidiosa* [phytopathogène de la maladie de Pierce pour le raisin entre autres] modifie son transcriptome (ensemble des gènes transcrits). Dans ce cas particulier, 261 gènes sont induits et 222 gènes sont réprimés (Koide et al., 2006). La Figure 1.2-1 illustre que plusieurs groupes de gènes peuvent être définis, les plus rapides étant très fortement exprimés 25 minutes seulement après le choc.

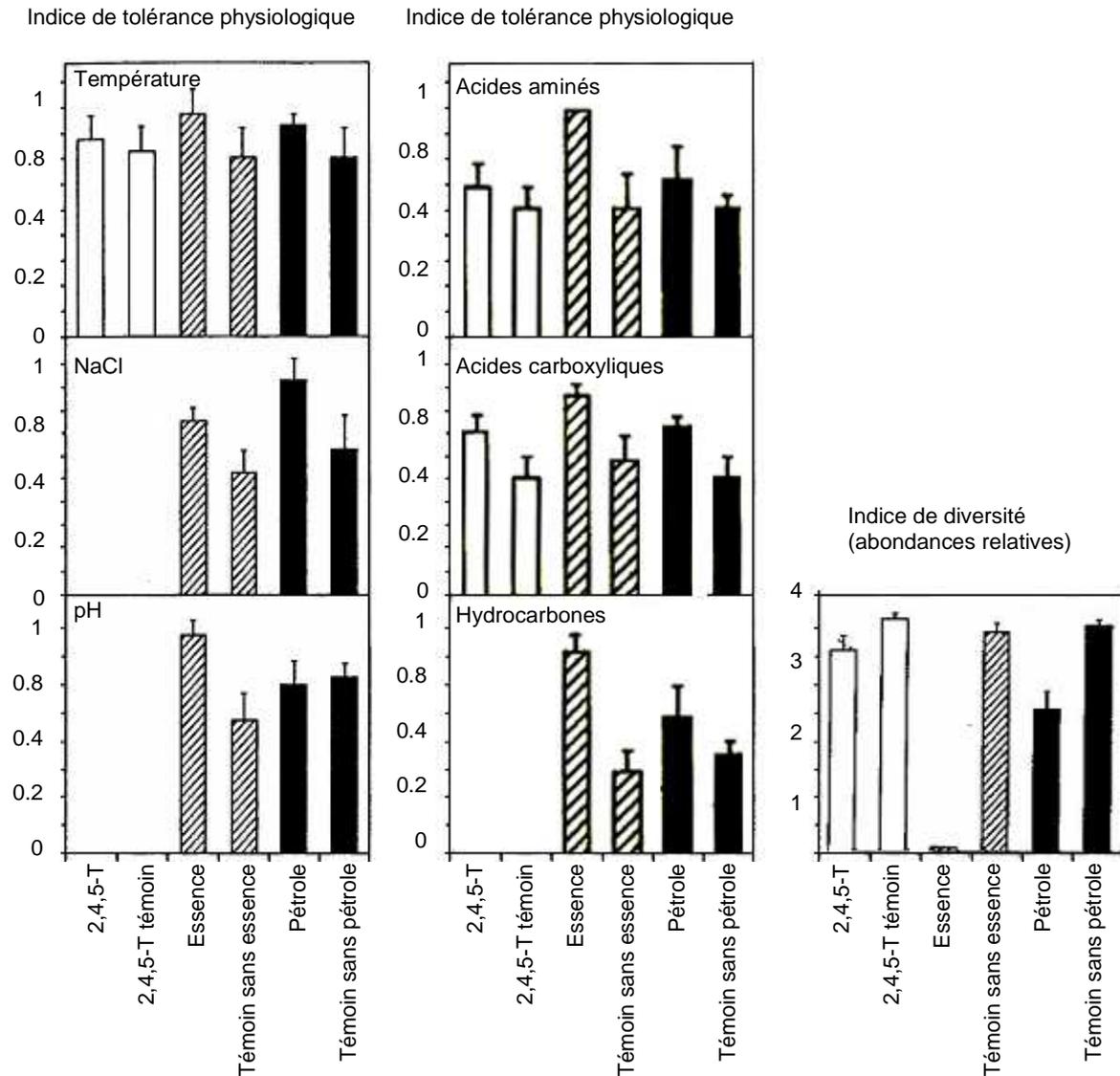


**Figure I.2-1 : Changement du transcriptome en cas de choc thermique (Koide et al., 2006)**

Le coefficient  $M = \log_2 (\text{expression}_{40^\circ\text{C}} / \text{expression}_{29^\circ\text{C}})$ , représenté en ordonnée permet de rendre compte des modifications d'expression entre les cellules subissant la brutale augmentation de température ( $40^\circ\text{C}$ ) et les cellules servant de témoin (à  $29^\circ\text{C}$ ). L'axe des abscisses indique le nombre de minutes après un changement de température. Le groupe 1 correspond à des gènes codant pour des protéines chaperons et des protéines « d'adaptation », le groupe 2 a été associé à des fonctions en relation avec des phages et la dégradation de petites molécules, le groupe 3 code pour des composants de la membrane et des facteurs de transcription, le groupe 4 comporte des gènes de pathogénicité, de virulence, de production de toxines, de détoxification, de protéines de transport et de sécrétion de peptides, le groupe 5 peut jouer un rôle dans la respiration aérobie, la synthèse de petites molécules et la production de protéines ribosomales entre autres, et le groupe 6 rassemble des gènes de métabolisme et de structure.

Dans le cadre d'une réponse physiologique, il est également possible que la diversité (i.e. capacité) métabolique au sein d'une même espèce (Aertsen and Michiels, 2005) lui confère un avantage. Par exemple, Karthikeyan *et al.* (1999) ont montré que la chloration induisait une différence métabolique pour les communautés bactériennes sessiles. De même, la versatilité des  $\epsilon$ -proteobactéries peut jouer un rôle lors de conditions environnementales changeantes, par exemple près de fumeurs noirs (Campbell *et al.*, 2006)

D'une manière générale, la versatilité physiologique semble être un trait des populations qui sont présentes dans les conditions changeantes. Par exemple, comme l'illustre la Figure I.2-2, les populations cultivables dominantes dans des communautés perturbées montrent à la fois une plus grande tolérance physiologique en cas de changement de conditions environnementales et une plus grande capacité d'utilisation de substrat (Atlas *et al.*, 1991).



**Figure I.2-2 : Tolérance physiologique, capacité d'assimilation de sources carbonées et indice de diversité d'une communauté perturbée (Atlas et al., 1991)**

Des mésocosmes ont été perturbés avec de l'acide acétique tricholophenoxygique (2,4,5-T), de l'essence ou du pétrole. Une centaine de souches bactériennes ont été isolées après la perturbation. La tolérance par rapport à la température, au sel et au pH ont été caractérisées (1<sup>ère</sup> colonne). De même, les capacités de dégrader des sources de carbone variées comme des acides aminés, des acides carboxyliques ou des hydrocarbonés ont été mesurées (2<sup>ème</sup> colonne). L'indice de Shannon a été calculé en tenant compte de l'abondance relative de chaque groupe taxonomique.

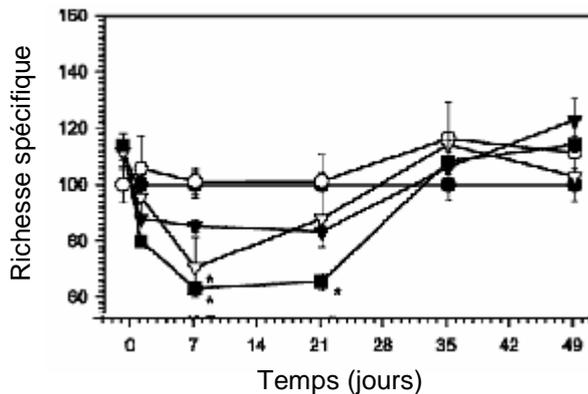
En conclusion, l'exposition à des composés biologiquement actifs peut favoriser les espèces à large spectre physiologique. On peut s'interroger sur une éventuelle diversité de flux dans ces organismes, mais les moyens d'études actuels ne permettent pas encore d'intégrer la complexité intracellulaire. L'étude d'Atlas et al. (1991) met également en évidence une variation des abondances relatives en cas de choc. C'est ce que nous allons étudier par la suite.

### 1.2.2.2. Quelques exemples de réactions impliquant un changement d'abondance

Dans certains écosystèmes, un choc suffisamment fort peut induire un changement des abondances relatives des populations microbiennes. Nous proposons de détailler quatre exemples pour mettre en évidence que :

- 1) un choc peut diminuer transitoirement la richesse et le fonctionnement d'une communauté,
- 2) une fonction stable peut revenir à son état initial plus rapidement que la structure,
- 3) le temps de retour à l'état initial après une perturbation dépend de la structure initiale de la communauté,
- 4) des événements antérieurs peuvent modifier la composition de la communauté et modifier ainsi la résilience écologique et la résilience d'ingénierie,

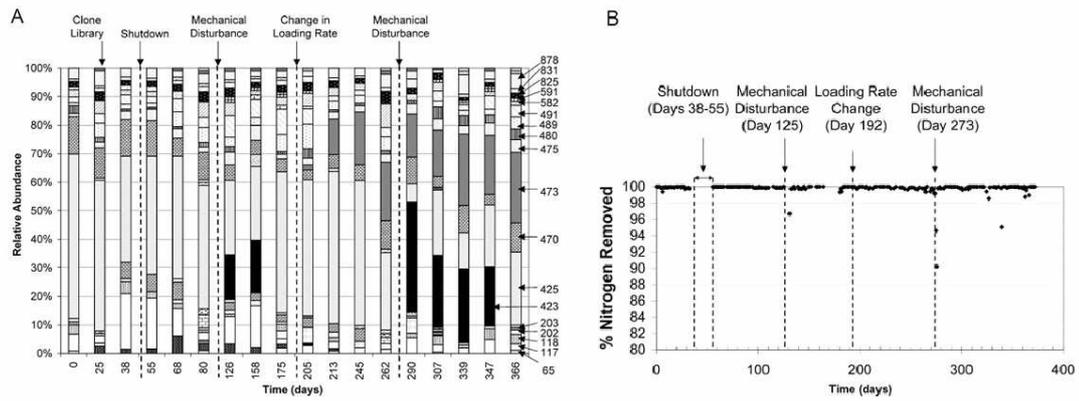
Notre premier exemple s'appuie sur des microcosmes d'eau de mer. Ces microcosmes se composent de phytoplancton et de zooplancton. L'addition de biocides potentiellement actifs sur les organismes [des tétracyclines utilisées en pharmacie] provoque une diminution transitoire de la richesse spécifique et de l'abondance totale de phytoplancton (Wilson et al., 2004). Le zooplancton n'est pas affecté. Cet exemple illustre qu'un système peut être totalement résilient à un choc artificiel contrôlé.



**Figure 1.2-3 : Diminution temporaire de la richesse du phytoplancton dans des mésocosmes soumis à des biocides (Wilson et al., 2004)**

*L'axe des abscisses indique le nombre de jours d'incubation, l'axe des ordonnées indique la richesse spécifique en indiquant le nombre de taxons uniques.*

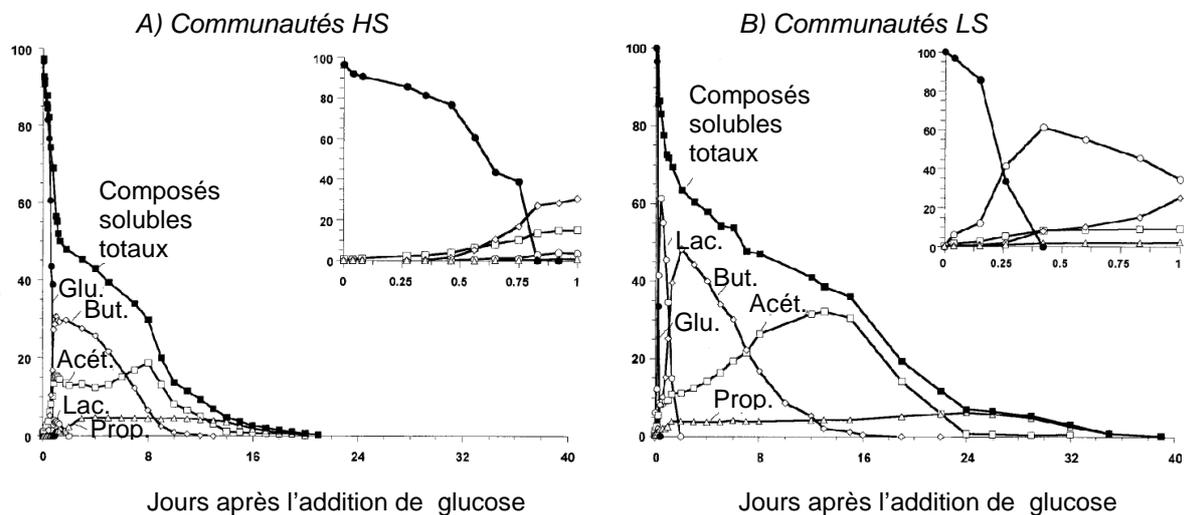
Notre deuxième exemple est un biofilm dénitrifiant. En fonctionnement stable, le nitrate peut être éliminé à plus de 99% par une communauté bactérienne dont l'empreinte moléculaire est stable dans le temps (i.e. constante) (Gentile et al., 2006). Lors d'une surcharge organique ou d'un choc d'ordre mécanique, de nouvelles bandes apparaissent sur les empreintes moléculaires, traduisant un changement des communautés microbiennes (Figure 1.2-4). Cet exemple montre que les communautés microbiennes peuvent avoir un temps de retour à l'état initial bien plus long que le fonctionnement (20 jours au lieu de 6 jours).



**Figure I.2-4 : Réaction d'une communauté dénitrifiante à des divers chocs (Gentile et al., 2006)**

A ; représente les populations microbiennes du réacteur dénitrifiant identifiées par empreinte moléculaire. Les chocs (jeûne, perturbation mécanique, changement de charge) imposés au réacteur et la date de la banque de clones sont indiqués par des flèches. Les nombres à droite correspondent au nombre de paires de bases des fragments. B ; correspond aux données fonctionnelles du réacteur dénitrifiant. Les chocs imposés au réacteur sont indiqués par des flèches.

Notre troisième exemple concerne deux communautés différentes de digestion anaérobie (nommées LS et HS) qui ont été inoculées dans huit réacteurs. Ces huit réacteurs ont subi une addition brutale de glucose, ce qui provoque l'accumulation de produits intermédiaires indiquée sur la Figure I.2-5. Le temps de retour à l'état initial (caractérisant la résilience d'ingénierie) est plus court pour les communautés HS que pour les communautés LS.



**Figure I.2-5 : Accumulation de produits intermédiaires après l'addition de glucose**

Accumulation de glucose (Glu.), de lactate (Lac.), de butyrate (But.), d'acétate (Acét.), de propionate (Prop.) et de composés solubles totaux ; deux communautés différentes (A ; communauté HS ou B ; communauté LS)

Notre quatrième exemple s'appuie sur deux exemples de communautés du sol soumises à des traitements modifiant la structure des communautés bactériennes (Griffiths et al., 2004, Girvan et al., 2005). Ces traitements peuvent modifier à la fois la résilience écologique et la résilience d'ingénierie. Par exemple, la résilience écologique de la dégradation du 2,4 dichlorophénol (2,4 DCP) est plus faible pour un sol minéral abritant peu de diversité que pour un sol organominéral diversifié. En effet, l'application de benzène inhibe la dégradation de 2,4 DCP dans les sols minéraux à l'échelle de temps utilisée alors que cette inhibition n'est que temporaire dans les sols organominéraux (Girvan et al., 2005).

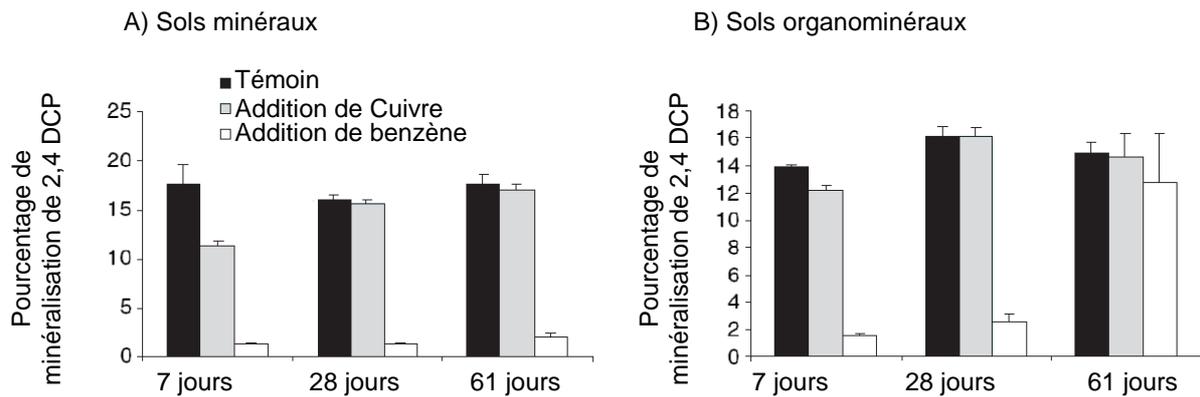


Figure I.2-6 : Résilience écologique forte des écosystèmes divers

La résilience fonctionnelle par rapport à la fonction particulière de la dégradation du 2,4 dichlorophénol est supérieure dans les sols à forte diversité

Certains traitements (fumigation au chlore ou dilution) induisant des modifications de structure diminuent la résilience d'ingénierie pour certains sols. Comme indiqué Figure I.2-7, un sol fumigé pendant 24 heures a une cinétique de résilience différente après un choc thermique. Des sols stérilisés puis réinoculés ne montrent pas de différences de résilience, quelle que soit la dilution de l'inoculum (Griffiths et al., 2004). Le fait que la différence de résilience ne soit pas visible pour tous les sols suggère que la résistance et la résilience dépendent de certaines espèces clés (keystone).

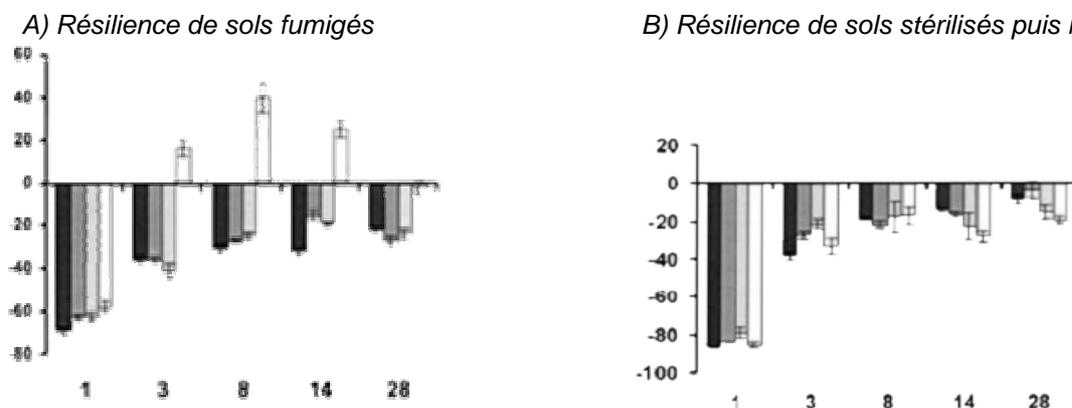


Figure I.2-7 : Résilience de sols fumigés ou irradiés puis ré-inoculés avec différentes dilutions en réponse à un choc température (Griffiths et al., 2004).

Le pourcentage de respiration (évolution de CO<sub>2</sub> sur 24h) de résidus végétaux ajoutés au sol 1,3,8,14 et 28 jours après un choc de température (40°C pendant 18h) par rapport à un contrôle non perturbé. A ; les sols ont préalablement subi 0 h (barres noires), 0.5 h (gris foncé), 2 h (gris clair) ou 24 h (blanc) de fumigation au chlore. B ; les sols ont été irradiés puis ré-inoculés avec des dilutions 10<sup>2</sup> (barres noires), 10<sup>4</sup> (gris foncé), 10<sup>6</sup> (gris clair) ou 10<sup>8</sup> (blanc).

En conclusion, un choc diminue en général l'activité de façon transitoire. Cette diminution d'activité est en général liée à une transition (« shift ») de communautés, mais pas forcément à une simplification. La résilience fonctionnelle peut être plus rapide que la résilience structurelle.

### **1.2.3. Les mécanismes de la résilience des systèmes microbiens**

#### ***1.2.3.1. Forme de « résistance » moins active***

Les micro-organismes sont plus sensibles lorsqu'ils sont actifs. Nous avons vu précédemment que des changements d'expression pouvaient avoir lieu en cas de changement des conditions environnementales. Ces changements d'expression favorisent la tolérance à un choc mais peuvent rendre la cellule moins active. D'une manière générale, les antibiotiques se lient à une protéine et rendent sa fonction toxique (Pour revue (Lewis, 2007)). Par exemple, les aminoglycosides interrompent la traduction des protéines, ce qui a pour effet de synthétiser des peptides toxiques. On peut donc distinguer la résistance stricte, qui est un mécanisme empêchant l'antibiotique de se lier à sa cible, et la tolérance, qui a lieu car la fonction cible n'est pas activée. Dans ce cas, il semble logique qu'une cellule peu active métaboliquement soit moins affectée par un antibiotique : Certaines études (Tuomanen et al., 1986, Eng et al., 1991, Schierholz et al., 1998) montrent que l'action bactériolytique de certains antibiotiques [Rifamicine, Penicilline, Cefotaxime] sur des cultures de souches « pures » est en effet proportionnelle au taux de croissance.

Cependant, d'autres antibiotiques [dermaseptins] sont plus actifs sur des cellules en croissance lente que sur des cellules en croissance rapide (Jouenne et al., 1998). Par exemple, une croissance lente due à une limitation de substrat peut engendrer une sensibilité accrue aux antibiotiques [quinolones] (Dalhoff et al., 1995). Il semble donc difficile de généraliser à ce sujet. En revanche, il paraît raisonnable de considérer que des cellules plus ou moins sensibles à un choc particulier co-existent dans une communauté. Un choc modifiera par conséquent les abondances relatives des espèces, ce qui peut conduire à une diminution de la richesse, comme nous le détaillons dans le paragraphe suivant.

#### ***1.2.3.2. Diminution de la richesse et succession d'espèces***

Delbes et ses collaborateurs (2001b) ont étudié un réacteur anaérobie par SSCP. Le réacteur cesse de fonctionner transitoirement à cause d'un événement inconnu. La digestion anaérobie étant interrompue, l'un des produits intermédiaires de la digestion s'accumule [l'acétate], provoquant ainsi une « crise » d'acétate. Lors de cette crise d'acétate, un phylotype associé à un *Clostridium* est devenu transitoirement très important. Cette crise engendre également un changement d'activité dans

la population archée (les ARNr de Methanobacterales sont remplacés des ARNr d'une espèce acétoclaste). Cet exemple montre qu'un choc peut induire une succession de populations bactériennes plus importante que la dynamique lors d'un fonctionnement stable (Delbès et al., 2000).

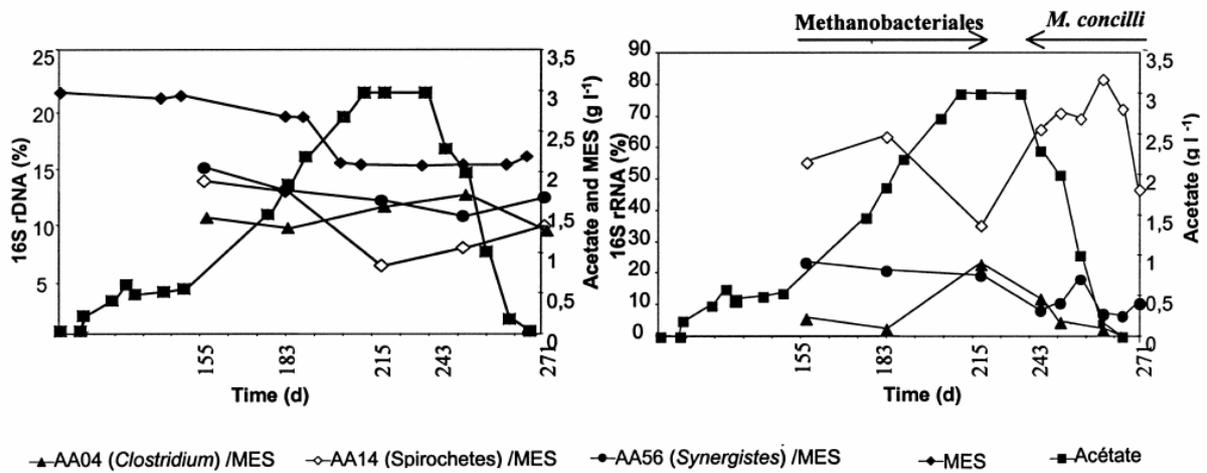


Figure I.2-8 : Changement d'abondance de quelques phylotypes bactériens lors d'une crise d'acétate dans un réacteur anaérobie (Delbès et al., 2001b).

En conclusion, les communautés peuvent potentiellement être « marquées » de façon durable par des événements ponctuels de grande amplitude ou des événements continus de petite amplitude. Ces deux types d'événements peuvent agir sur la diversité métabolique (propriétés physiologiques), la richesse spécifique (combien d'espèces sont présentes) et la diversité spécifique (quelles espèces sont présentes) (Figure I.2-9). Nous allons voir dans la partie suivante les facteurs qui favorisent la résilience écologique et la résilience d'ingénierie en agissant sur ces trois mécanismes.

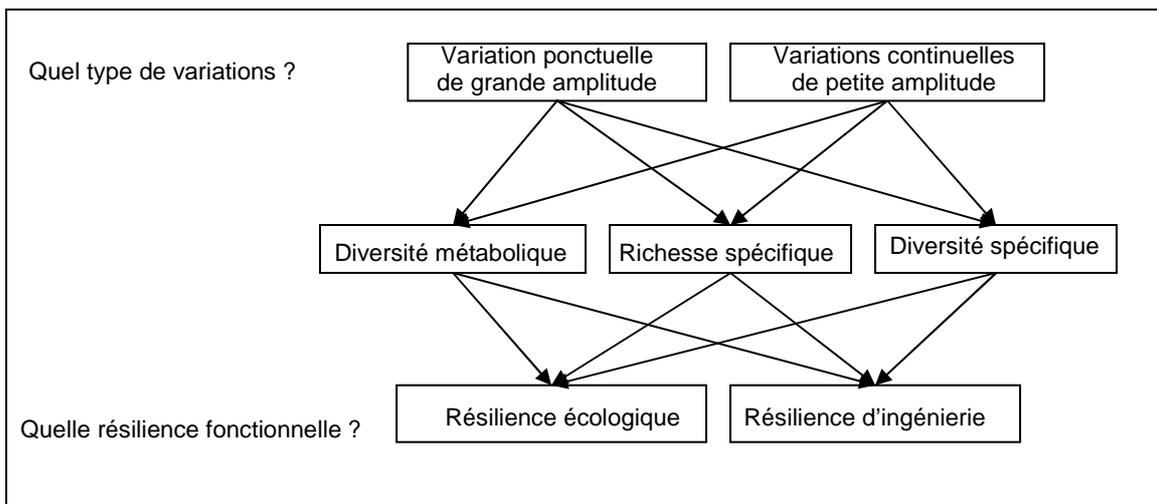


Figure I.2-9 : Variétés des mécanismes potentiellement mis en jeu pour la résilience

### **I.2.4. Les facteurs favorisant la résilience fonctionnelle des écosystèmes**

#### **microbiens**

Nous avons vu précédemment que la résilience et la résistance des écosystèmes microbiens pouvaient intervenir à différents niveaux d'organisation. Dans cette partie, nous nous intéressons aux forces pouvant influencer sur ces niveaux d'organisation vers un état plus résilient.

##### *I.2.4.1. Un stress ponctuel antérieur*

Les sols sont soumis à des pratiques culturales variées et il est très intéressant d'un point de vue appliqué d'avoir du recul sur les conséquences de ces pratiques culturales sur la stabilité (i.e. résistance et résilience d'ingénierie).

Pour qualifier l'effet de stress antérieurs sur la résilience fonctionnelle, différents chocs ont été appliqués à des sols préalablement manipulés. Le fonctionnement des sols est communément caractérisé par la respiration communautaire ou l'assimilation de carbone (Griffiths et al., 2000, Griffiths et al., 2004, Griffiths et al., 2005, Tobor-Kaplon et al., 2005, Tobor-Kaplon et al., 2006a, Tobor-Kaplon et al., 2006b ).

Par exemple, des chocs ont été appliqués à des sols exposés au cuivre (750 kg ha<sup>-1</sup>) et/ou à des pH bas (pH 4.0) pendant vingt années (Tobor-Kaplon et al., 2005). Le fonctionnement des communautés microbiennes peut être estimé à partir de variables agrégées comme la respiration totale, ou les taux de croissance bactérien et fongique. Toutefois, les taux de croissance sont à considérer avec précaution car ils présentent parfois une grande variabilité (Tobor-Kaplon et al., 2006b). Les résultats concernant les communautés microbiennes du sol sont résumés dans la Table I-1.

Remarquons que la respiration communautaire et le taux de croissance bactérienne (estimée par l'incorporation de thymidine) peuvent réagir différemment (Tobor-Kaplon et al., 2006a), rendant l'utilisation des variables agrégées délicate. L'interprétation se doit par conséquent d'être prudente et de tenir compte des variables de réponse considérées.

Comme indiqué Table I-1, il est possible d'agir sur la résilience fonctionnelle par un traitement antérieur. Différents traitements peuvent induire des changements de structure mesurables des communautés bactériennes. En ce sens, les communautés du sol ont une mémoire des événements de grande amplitude, comme des additions de métal. Par exemple, le changement des communautés est plus important lorsqu'elles sont exposées au mercure que lorsqu'elles sont exposées au cuivre (Ranjard et al., 2006a). Les analyses des communautés microbiennes par empreinte moléculaire ne sont pas toujours assez sensibles pour caractériser les modifications suite à un traitement. En effet, bien que la structure des communautés change de façon similaire suite à l'application de boues d'épuration ou de biocide, leur réaction à un choc est différente (Kuan et al., 2006).

**Table I-1 : Modification de la résilience par un stress antérieur lointain**

Stress historique	Choc	Résilience de la fonction (effet statistique du temps sur la respiration communautaire)	Référence
Cuivre (750 kg ha <sup>-1</sup> ), pH 6	Pb (1 g kg <sup>-1</sup> )	Non résiliente	(Tobor-
Sans addition de Cuivre, pH 6	Pb (1 g kg <sup>-1</sup> )	Non résiliente	Kaplon et al., 2005)
Cuivre (750 kg ha <sup>-1</sup> ), pH 4	Pb (1 g kg <sup>-1</sup> )	Non résiliente	
Sans addition de Cuivre, pH4	Pb (1 g kg <sup>-1</sup> )	Non résiliente	
Cuivre (750 kg ha <sup>-1</sup> ), pH6	Salinité (6.67 g kg <sup>-1</sup> )	Résiliente	
Stress minimal : pas d'addition de Cuivre, pH6	Salinité (6.67 g kg <sup>-1</sup> )	Respiration plus résiliente que le sol traité au cuivre	
Cuivre (750 kg ha <sup>-1</sup> ), pH4	Salinité (6.67 g kg <sup>-1</sup> )	Résiliente	
Sans addition de Cuivre, pH4	Salinité (6.67 g kg <sup>-1</sup> )	résilience plus rapide que le sol traité au cuivre	
Eloignement d'une source de (Cd, Zn)	Pb (1 g kg <sup>-1</sup> )	Même résilience	(Tobor-Kaplon et
Eloignement d'une source de (Cd, Zn)	Salinité (6.67 g kg <sup>-1</sup> )	Respiration non résiliente	al., 2006b)
Eloignement d'une source de (Cd, Zn)	Chaleur (50°C, 18h)	Respiration résiliente	
Fumigation au Chlore (F0.5h, F2heures)	Chaleur (40°C, 18h)	Partiellement résilient	(Griffiths et al., 2004)
Fumigation au Chlore (F24heures)	Chaleur (40°C, 18h)	Respiration supérieure au témoin	
Stérilisation et réinoculation de dilutions	Chaleur (40°C, 18h)	Résilience supérieure aux sols fumigés	
Fumigation au Chlore (F0.5h, F2heures)	CuSO <sub>4</sub> (0.5 g kg <sup>-1</sup> )	Non résiliente	
Fumigation au Chlore (F24heures)	CuSO <sub>4</sub> (0.5 g kg <sup>-1</sup> )	Non résiliente	
Stérilisation et réinoculation de dilutions	CuSO <sub>4</sub> (0.5 g kg <sup>-1</sup> )	Non résiliente	
Fumigation au chlore jusqu'à 24h	Chaleur (40°C, 18h)	Résiliente	(Griffiths et al.,
Fumigation au chlore jusqu'à 24h	CuSO <sub>4</sub> (0.5 g kg <sup>-1</sup> )	Moins rapidement résilient que les témoins	2000)
Réinoculation, application de boues d'épuration, biocide	Chaleur (40°C, 18h)	Moins rapidement résiliente que le témoin	(Kuan et al., 2006)
Réinoculation, application de boues d'épuration, biocide	CuSO <sub>4</sub> (1 g kg <sup>-1</sup> )	Non résiliente	

En conclusion, il est possible, d'agir sur la résilience par des pratiques culturales. Les techniques moléculaires ne sont pas toujours assez fines pour caractériser les changements induits. De même, les variables agrégées peuvent fournir des réponses différentes. Cependant, ce sont les moyens d'observation les plus adaptés à l'étude des systèmes microbiens à l'heure actuelle et bien que n'étant pas parfaits, ils n'en demeurent pas moins utiles. Ces pratiques culturales sont des événements assez fort et ponctuels qui agissent sur la diversité métabolique et/ou la structure de la communauté. Cependant, des perturbations continues peuvent également agir sur la diversité métabolique des espèces (espèces adaptées aux perturbations) ou la structure de la communauté.

#### 1.2.4.2. Des perturbations intermédiaires continues

a) Les communautés soumises aux perturbations ont des populations plus tolérantes

Les cellules microbiennes sont confrontées aux variations de l'environnement de façon très brutale, contrairement aux cellules d'organismes multicellulaires qui bénéficie d'une certaine homéostasie. Toutes les cellules sont cependant adaptées à ces variations environnementales. Elles peuvent, par exemple, entrer dans un état physiologique de stress si elles sont exposées à des variations de température, d'oxygène, de pH, de force osmotique, de concentrations en nutriments, d'antibiotiques, ou de pression (Ahring et al., 2003). L'entrée dans cet état physiologique est régulé au niveau génique par des gènes codant pour des protéines nommées historiquement « Hsp » (« Heat-shock protein »).

Ces protéines peuvent être des protéines chaperonnes qui préviennent la dénaturation des autres protéines fonctionnelles, ou des protéines stimulant la renaturation après une dénaturation.

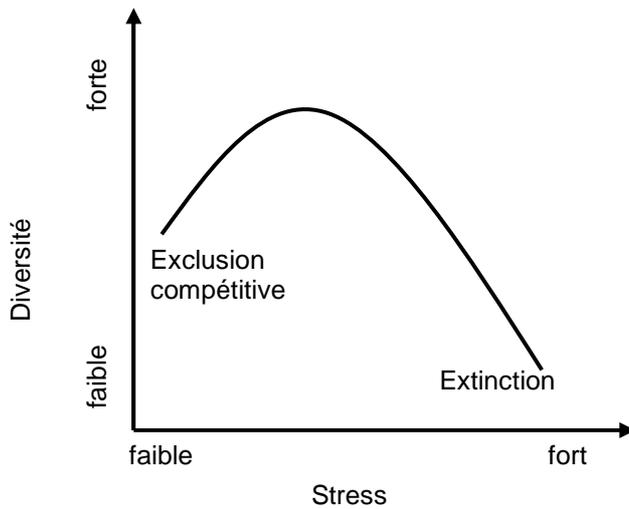
L'expression de ces protéines peut être induite annihilée en cas de choc, ce qui provoque un changement d'expression inhibant l'activité initiale des micro-organismes. Cet état peut être maintenu plusieurs jours. Les perturbations antérieures peuvent donc induire une plus grande tolérance des populations à un choc.

b) Les perturbations modifient la diversité au sein d'une population

Des études en microcosmes ont montrées que des perturbations génèrent une plus grande variété phénotypique au sein d'une population de *Pseudomonas fluorescens* (Buckling et al., 2000).

#### 1.2.4.3. Une richesse plus importante engendre une forte résilience fonctionnelle

Des études expérimentales utilisant le phytoplancton soutiennent l'hypothèse des perturbations intermédiaires (*IDH-Intermediate Disturbance Hypothesis*) (Sommer, 1995, Floder and Sommer, 1999, Yamamoto and Hatta, 2004). Selon cette hypothèse (Figure 1.2-10), la richesse spécifique et la diversité seraient maximales pour des perturbations de fréquences et d'amplitudes intermédiaires : si l'environnement est « trop stable », il y a exclusion compétitive, et s'il est « trop instable » il y a disparition d'un grand nombre d'espèces. Puisqu'une plus grande diversité peut dans certains cas augmenter la résilience (Girvan et al., 2005), un environnement moyennement stable devrait offrir une grande résilience.



**Figure I.2-10 : Hypothèse des stress intermédiaires (Giller et al., 1998)**

Cependant, des études expérimentales sur des communautés du sol et sur des communautés anaérobies montrent qu'une forte dilution (donc une élimination des populations rares et diminution de la richesse spécifique) n'affecte pas le fonctionnement de ces communautés (estimé par la minéralisation de matière organique, dénitrification et nitrification (Wertz et al., 2006), assimilation de glucose, d'acétate, de citrate, d'acide palmitique ou d'un mélange d'acides aminés (Franklin and Mills, 2006). La richesse spécifique serait donc un facteur moins crucial pour la résilience que le nombre de voies métaboliques parallèles.

#### *1.2.4.4. Des voies métaboliques parallèles favorisent une forte résilience fonctionnelle*

Nous avons vu au paragraphe I.1.2.2.c) que la redondance fonctionnelle équivaut pour le flux à une diversité de cheminements possibles. Nous avons vu qu'il existe des arguments théoriques prédisant que la résilience augmente avec la diversité des cheminements. Hashsham a étudié le flux de digestion anaérobie pour tester cette hypothèse. Les auteurs ont mis en place deux lots de réacteurs en quadruplicats. Chaque lot a été inoculé avec une communauté de digestion anaérobie. Le premier lot (nommé lot HS) est caractérisé par une dominance de *Spirochetes* et par un pourcentage élevé de *Methanosarcina*. Le second lot (nommé lot LS) est caractérisé par peu de *spirochetes* et par un pourcentage élevé de *Methanosaeta*. Lorsque ces deux lots sont soumis à une addition brutale de glucose, les produits intermédiaires de la digestion anaérobies s'accumulent de façon différente comme indiqué Figure I.2-5. Ils s'accumulent de façon simultanée pour les communautés HS (indiquant une dégradation simultanée) alors qu'ils s'accumulent de façon séquentielle (indiquant une dégradation selon une voie trophique) pour les communautés LS. Les communautés dégradant le glucose selon plusieurs voies parallèles ont un temps de retour plus court, comme le suggère la théorie (I.1.2.2).

#### 1.2.4.5. Environnement hétérogène

Les cellules s'associent fréquemment pour former un biofilm. Cette association est souvent organisée spatialement. Ainsi les couches superficielles peuvent servir de « barrières » à un stress environnemental.

De plus, l'hétérogénéité spatiale du biofilm peut engendrer une différence d'expression chez les cellules qui en font partie. Les mécanismes de réponse à un stress peuvent dès lors différer des mécanismes des cellules libres. Par exemple, les bactéries de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* sont 1000 fois plus résistantes à la tobramycine lorsqu'elles sont associées en biofilm car elles sécrèteraient alors des polysaccharides piégeant cet antibiotique dans l'espace périplasmique (Mah and O'Toole, 2001, Mah et al., 2003).

Des études en mésocosmes ont montré que des perturbations intermédiaires et l'importance du flux de nutriments n'engendraient une diversité phénotypique de *Pseudomonas fluorescens* que dans les environnements hétérogènes (Buckling et al., 2000, Kassen, 2000 ).

### **1.3. Conclusion de l'étude et stratégie adoptée pour la thèse**

La résilience, qui signifie le retour à l'état initial après un choc, a été découpée et définie de plusieurs manières. Le premier groupe de définitions s'intéresse au passage à d'autres états stables : c'est la résilience écologique. Le deuxième groupe de définitions est plus centré sur la cinétique de retour d'une variable de réponse intéressante (résilience d'ingénierie).

Les macro-systèmes se heurtent à beaucoup de problèmes expérimentaux pour tester des hypothèses sur la résilience. Un des inconvénients majeurs est la taille et l'échelle d'observation des systèmes considérés qui empêchent l'expérimentation. Des modèles ont été réalisés avec des assemblages de zooplancton, mais ces modèles ont souvent une approche réductionniste. En effet, ces modèles sont souvent un assemblage artificiel d'espèces. En outre, cette approche néglige les interactions qui peuvent avoir lieu dans des écosystèmes complexes.

Les progrès techniques rendent aujourd'hui possible l'observation fine de communautés microbiennes, plaçant de ce fait l'écologie microbienne dans une position privilégiée pour tester des hypothèses avec une approche holistique sur des systèmes réels. En effet, les systèmes microbiens sont aisément manipulables et observables sur un grand nombre de générations.

Les études sur le milieu marin et sur le milieu anaérobie en particulier sont complémentaires. Les études sur le milieu marin sont très nombreuses (Kemp and Aller, 2004, Venter et al., 2004), car ces communautés microbiennes sont centrales pour le cycle du carbone à l'échelle de la planète. Comme nous le verrons plus loin, de nombreuses techniques ont été développées pour étudier finement ces cellules impliquées dans ce cycle du carbone.

Les études sur le fonctionnement des systèmes microbiens de dépollution sont nombreuses car ces consortia sont utilisés par l'homme depuis des décennies pour le traitement des déchets. Ces dernières années, l'application de techniques moléculaires a permis de mieux cerner la dynamique de ces systèmes (Godon et al., 1997b, Fernandez et al., 1999, Fernandez et al., 2000b, Hashsham et al., 2000). Leur confinement permet d'étudier précisément l'effet de l'histoire sur leur évolution.

Ainsi, ce travail se propose de tester des principes décrits en écologie pour des systèmes théoriques à propos de la résilience fonctionnelle. Quelques données sont déjà disponibles dans le sol, mais le milieu marin et le milieu anaérobie sont des milieux d'études complémentaires encore peu étudiés.

Le Chapitre II présente les avancées dans l'analyse des empreintes moléculaires (interprétation et traitement par un programme Matlab™). Ce chapitre rappelle rapidement le principe des empreintes moléculaires et dégage les hypothèses implicites admises lors de l'interprétation. Ces hypothèses et leurs conséquences en terme d'interprétation sont reprises dans l'article publié dans *Environmental Microbiology*, qui montre que l'interprétation des fingerprints peut être plus fine que ce qui est habituellement fait. Nous verrons qu'un logiciel spécifique était nécessaire pour l'interprétation des empreintes SSCP.

Le Chapitre III utilise la SSCP pour comprendre la résilience fonctionnelle de deux communautés bactériennes hétérotrophes marines d'origine (et d'histoire) différentes. Nous présenterons le flux de carbone en tant que « fonction » du milieu marin en nous intéressant plus particulièrement à la composante bactérienne de ce flux. Nous présenterons ensuite les quatre chemostats et le choc qui ont été utilisés pour quantifier la résilience fonctionnelle. Les résultats sont présentés sous forme d'article. Nous verrons qu'en l'absence de prédation, les mêmes mécanismes de résilience interviennent, mais leur cinétique est différente. Certains résultats complémentaires permettent de discuter un peu plus ces résultats, sans modifier la conclusion générale : des facteurs historiques modifient les propriétés de résilience.

Le chapitre IV teste l'importance d'un facteur historique particulier : les fluctuations continues de l'environnement. Après avoir présenté brièvement la digestion anaérobie, nous décrivons les quatre réacteurs utilisés pour étudier la sélection par des petites perturbations continues. L'effet structurant des petites perturbations en termes de population, de fonction et de résilience fonctionnelle est présenté sous forme d'article.

Le Chapitre V propose quelques conclusions et perspectives suite à ce travail.

## **CHAPITRE II : Développement d'outils pour l'analyse des empreintes moléculaires SSCP**

<b>II.1. INTRODUCTION.....</b>	<b>58</b>
II.1.1. PRELIMINAIRE	
II.1.2. HYPOTHESES IMPLICITES CONCERNANT LES EMPREINTES MOLECULAIRES	
<b>II.2. MOLECULAR FINGERPRINTING (DGE, SSCP) REVISITED BY SIMULATION AND USED AS TOOLS TO MEASURE MICROBIAL DIVERSITY .....</b>	<b>63</b>
<b>II.3. LES DIFFICULTES D'UTILISATION DE LA SSCP.....</b>	<b>80</b>
<b>II.4. MESURER LA DIVERSITE (SIMPSON) PAR UNE EMPREINTE MOLECULAIRE.....</b>	<b>80</b>
<b>II.5. PROGRAMME SAFUM UTILISE POUR L'INTERPRETATION DES SPECTRES .....</b>	<b>82</b>
<b>II.6. CONCLUSION DE L'USAGE DE LA SSCP POUR L'ETUDE DE CONSORTIA .....</b>	<b>88</b>

## **II.1. Introduction**

Dans ce chapitre nous allons rappeler brièvement le principe des empreintes moléculaires et les approximations implicites qui sont faites pour les interpréter. Nous allons ensuite décrire les développements que nous avons apportés à l'analyse des systèmes microbiens par l'une des empreintes moléculaires (la SSCP en capillaire) en écartant certaines hypothèses implicites abusives. Ce développement comporte deux étapes :

- 1) la compréhension de l'influence que peuvent avoir les espèces faiblement abondantes sur l' « aire sous les pics »
- 2) la programmation d'un logiciel adapté au traitement des spectres SSCP, et qui permet de pallier certains manques des logiciels commerciaux, notamment en terme d' « aire sous les pics »

### **II.1.1. Préliminaire**

La fraction de bactéries qu'il est possible de cultiver en souches « pures » (i.e. formant une colonie) est limitée par rapport au nombre de bactéries que l'on peut dénombrer dans l'environnement par microscopie. La fraction cultivable peut varier de 0.001% dans le milieu marin à 15% dans les boues activées (Amann et al., 1995) . Bien que les informations fournies par la culture de bactéries soient très utiles, elles risquent d'être trop spécifiques pour pouvoir étudier l'écosystème dans son ensemble. Les progrès de la biologie moléculaire ont permis de caractériser l'information génétique présente sans être limité par une étape de culture. Le clonage permet de séquencer un certain nombre de fragments d'ADN présents dans le milieu, et révèle une diversité plus large que ce qui a été observé par culture (Dunbar et al., 1999). Bien qu'il soit aujourd'hui relativement rapide, il reste coûteux. La migration différentielle est une alternative beaucoup moins onéreuse pour caractériser un ensemble complexe de fragments d'ADN (l'ADN « communautaire »), ce qui explique que de nombreuses techniques de migration différentielle se soient développées après la publication séminale de Moyer et al. (1993)(Figure II.1-1).

Toutes les empreintes moléculaires actuelles ont comme points communs de débiter par une extraction d'ADN total, qui est suivie d'une amplification par PCR d'une région caractéristique et d'une migration différentielle des produits de PCR qui dépend de leur séquence.

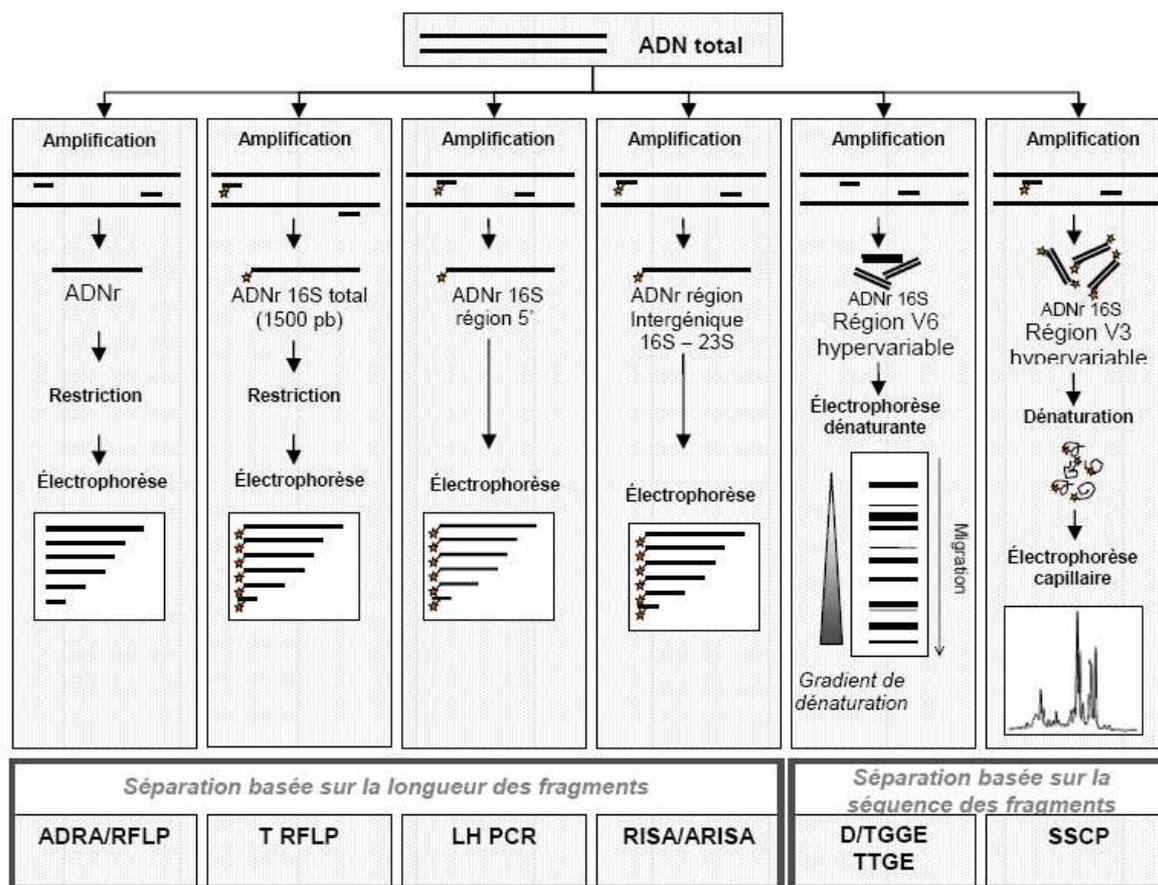


Figure II.1-1 : Les différentes techniques d'empreintes moléculaires (Cresson, 2006)

L'ADRA, la T-RFLP, la LH PCR, l'ARISA, la DGGE, TTGE et la SSCP sont des techniques d'empreintes moléculaires pour caractériser un mélange d'ADN complexe. Elles se basent sur une PCR puis une migration différentielle des brins amplifiés.

Pour interpréter les empreintes moléculaires, certains auteurs (Delbès et al., 2000) font les hypothèses suivantes :

- Tous les ADN ne sont pas extraits avec les mêmes rendements
- Seuls les ADN des espèces dominantes sont amplifiés par PCR
- La détection des fragments par empreinte moléculaire n'est pas quantitative

Ces trois hypothèses ont conduit à une interprétation manuelle sur la base de présence/absence. En effet, si le fingerprint n'est pas quantitatif à cause des biais d'extraction, des biais de PCR et de la détection des fragments par empreinte moléculaire, il peut sembler hasardeux de s'intéresser à l'abondance relative des pics. Nous allons cependant voir dans les paragraphes suivants que les deux dernières hypothèses sont fausses et que la première hypothèse n'empêche pas l'interprétation en termes d'abondance relative de chaque profil du moment que celle-ci s'effectue en normalisant tous les profils.

### **II.1.2. Hypothèses implicites concernant les empreintes moléculaires**

Lors d'une empreinte moléculaire, plusieurs hypothèses implicites sont admises, dont certaines sont des approximations dont il faut avoir conscience lors de l'interprétation des profils SSCP. Bien que les empreintes moléculaires soient soumises à des biais, il est possible de tirer un certain nombre d'informations sur les abondances *relatives*.

La première étape des empreintes moléculaires qui se développent depuis une dizaine d'années est d'extraire l'ADN communautaire complexe pour le caractériser et comparer des échantillons différents (Muyzer et al., 1993). D'autres techniques d'empreintes moléculaires se sont développées comme l'ARDRA (Massol-Deya et al., 1995), la LH-PCR (Ritchie et al., 2000), l'ARISA (Fisher and Triplett, 1999) ou la T-RFLP (Liu et al., 1997). Elles s'appuient toutes sur une extraction d'ADN. Le but de cette comparaison est de comparer les abondances relatives des différentes espèces. Ces abondances relatives induisent une diversité de cheminement du flux de matière et d'énergie. Cette comparaison s'appuie sur l'hypothèse implicite que tout l'ADN est extrait avec la même efficacité, ce qui est une approximation (Frostegard et al., 1999, Martin-Laurent et al., 2001, Stach et al., 2001, LaMontagne et al., 2002, Hall et al., 2006, Lakay et al., 2007). Cependant, il est raisonnable de penser que la sous-estimation d'une « espèce » liée à une mauvaise extraction est constante. Il est par conséquent logique de comparer des abondances *relatives* entre échantillons.

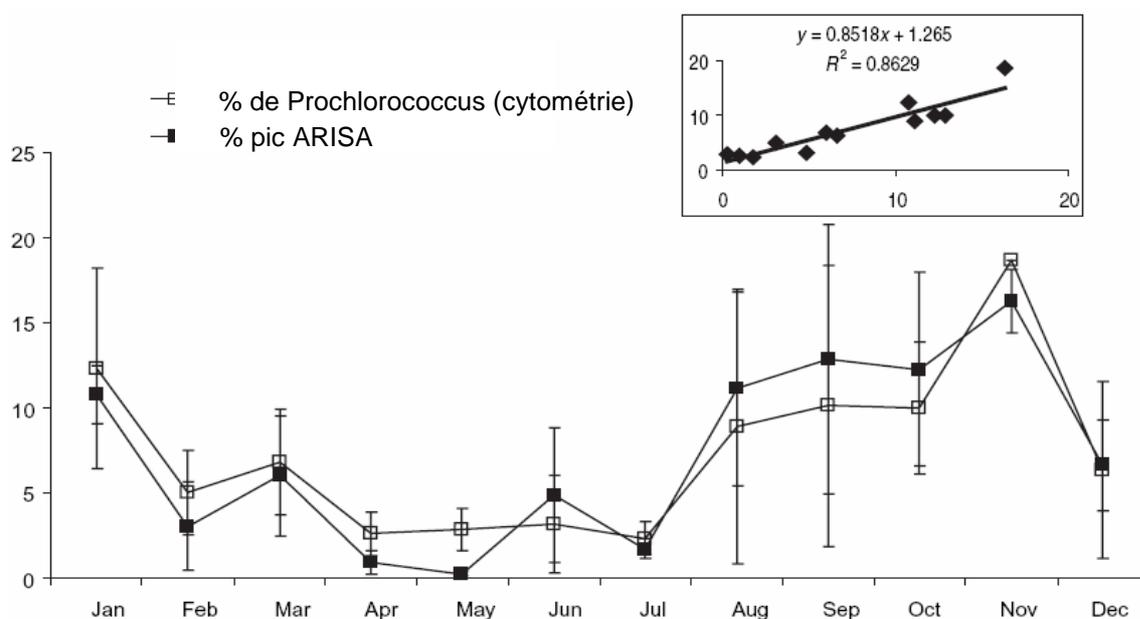
La deuxième étape des empreintes moléculaires est une amplification par PCR de la région servant à caractériser chaque « espèce » ou phylotype. Celle-ci peut amplifier préférentiellement certaines séquences selon les amorces sélectionnées (Kanagawa, 2003a, Baker and Cowan, 2004, King et al., 2005). Le biais induit est d'autant plus élevé que le nombre de cycles est important. Cependant, en comparant des produits de PCR comportant le même nombre de cycles, il est raisonnable de comparer des abondances relatives entre échantillons car ce biais est constant.

La troisième étape des empreintes moléculaires est la migration différentielle des fragments amplifiés et leur détection. La différence de migration électrophorétique peut reposer sur une différence de taille ou de conformation. La détection peut se faire en utilisant un intercalant de l'ADN ou en marquant directement les amorces avec un fluorophore visible. Dans tous les cas, cette détection repose sur l'hypothèse implicite que l'intensité du signal détecté est proportionnelle à la quantité d'ADN. Lorsque le signal est dû à un intercalant, le signal pourrait dépendre de la taille du fragment. Cependant, lorsque le signal est un fluorophore lié aux amorces, la quantité de signal émise est proportionnelle au nombre de fragments sans favoriser les fragments de grande taille.

La corrélation entre abondance d'un gène 16S et abondance d'une population suppose de plus qu'il existe peu de copies du gène ADNr 16S (Rocap et al., 2003) ce qui est contesté (Acinas et al., 2004a, Acinas et al., 2004b, Gonzalez-Escalona et al., 2005, Sadeghifard et al., 2006). Toutefois, plusieurs opérons au sein d'une cellule peuvent éventuellement témoigner d'une diversité de flux d'énergie. Par conséquent, la présence de deux opérons pourrait être une mesure pertinente de la diversité de cheminement de l'énergie. Il est par conséquent possible de caractériser les phylotypes présents sans faire la liaison avec des contextes cellulaires (« espèces » ?) présent(e)s, ce qui est approximatif. En d'autres termes, l'énergie passe par un certain nombre de voies, et les limites membranaires ne sont peut-être pas cruciales. Quoiqu'il en soit, la présence de plusieurs opérons

n'empêche pas les comparaisons de type : le phylotype A représente une plus grande proportion dans l'échantillon N que dans l'échantillon N+1.

Cependant, malgré les quatre biais potentiels cités précédemment, le pourcentage de l'aire d'un pic au sein d'une empreinte moléculaire *Prochlorococcus* est très proche numériquement du pourcentage de cellules de *Prochlorococcus* par rapport aux bactéries totales détecté par cytométrie (Brown et al., 2005). Bien que n'étant pas généralisable, ce résultat montre que les empreintes moléculaires sont parfois très proches de la « réalité ».



**Figure II.1-2 : Corrélation entre aire de pic et pourcentage de cellules pour *Prochlorococcus* (Brown et al., 2005)**

*Cellules de Prochlorococcus quantifiées en parallèle pendant une année par les deux méthodes : l'aire relative de leur pic ARISA et cytométrie pendant une année à une station marine entre le port de San Pedro et l'île de Catalina. La régression linéaire présentée dans l'insert a été réalisée avec l'abondance relevée en cytométrie et l'abondance relative sur l'empreinte ARISA sur 42 mois.*

La dernière hypothèse implicite généralement faite lors de l'interprétation des profils SSCP est que seules les espèces « majoritaires » sont visibles. Or nous savons qu'il existe un grand nombre d'espèces « minoritaires » dans l'environnement qui sont conservées après les étapes d'extraction et de PCR. Par exemple, un clonage d'un ADN de sol a trouvé 500 « espèces » sur 800 brins séquencés (Dunbar et al., 1999). Ce fait prouve que le postulat de base stipulant que « seuls les espèces majoritaires étaient amplifiées » était aussi flou qu'abusif (qu'est ce qu'une espèce « minoritaire » ?). De plus, plusieurs espèces faiblement abondantes peuvent créer une « bande » sur une empreinte, comme le montre une étude sur les rhizosphères qui a identifié 60 phylotypes sous une bande de gel SSCP (Schmalenberger and Tebbe, 2003).

Pour ces raisons, nous adopterons dans ce qui suit, les sept hypothèses suivantes pour l'interprétation des empreintes moléculaires basée sur la séquence des fragments :

- L'ADN de chaque population est extrait avec le même rendement
- L'abondance d'ADNr 16S reflète l'importance du flux de matière et d'énergie par une voie métabolique
- La PCR ne modifie pas les proportions relatives des différents phylotypes en amplifiant préférentiellement certaines séquences
- Une fraction homogène et représentative du produit de PCR est analysée par empreinte moléculaire
- Chaque séquence a un temps de rétention spécifique
- Les temps de rétention se répartissent de façon continue
- La détection de la quantité d'ADN correspondant à chaque temps de rétention est quantitative

Nous avons volontairement exclu l'hypothèse implicite que seules les espèces les plus abondantes étaient amplifiées par PCR (comme le montre la présence d'espèces rares dans les clonages) et génèrent un signal détectable (car il y a un fluorophore par brin amplifié même pour les espèces faiblement abondantes). Nous avons réalisé des simulations informatiques pour tester cette hypothèse afin d'estimer l'impact des espèces faiblement abondantes sur les profils SSCP.

Dans l'article qui suit, nous réalisons des simulations par ordinateur dans le but de déterminer l'empreinte d'un système comportant plus ou moins d'espèces faiblement abondantes. Ces simulations permettent de mieux comprendre les empreintes moléculaires, et donc d'employer un traitement approprié. Dans cet article, nous adoptons les sept hypothèses implicites suivantes :

- L'ADN de chaque population est extrait avec le même rendement
- L'abondance d'ADNr 16S reflète l'importance du flux de matière et d'énergie par une voie métabolique
- La PCR ne modifie pas les proportions relatives des différents phylotypes en amplifiant préférentiellement certaines séquences : *Toutes* les espèces sont amplifiées par PCR, y compris les espèces faiblement abondantes
- Une fraction homogène et représentative du produit de PCR est analysée par empreinte moléculaire
- Chaque séquence a un temps de rétention spécifique
- Les temps de rétention se répartissent de façon continue
- La détection de la quantité d'ADN correspondant à chaque temps de rétention est quantitative

## **II.2. Molecular fingerprinting (DGE, SSCP) revisited by simulation and used as tools to measure microbial diversity (published in Environmental microbiology)**

Patrice Loisel<sup>1</sup>, Jérôme Harmand<sup>1,2</sup>, Olivier Zemb<sup>2,3</sup>, Eric Latrille<sup>2</sup>, Claude Lobry<sup>1</sup>, Jean-Philippe Delgenès<sup>2</sup> and Jean-Jacques Godon<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> INRA-INRIA MERE Research team, UMR Analyse des Systèmes et Biométrie, ENSAM Institut National de la Recherche Agronomique, Montpellier, France

<sup>2</sup> Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Institut National de la Recherche Agronomique, Avenue des Etangs, 11100 Narbonne, France.

<sup>3</sup> Laboratoire Arago, Observatoire Océanologique, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National des Sciences de l'Univers, Université Paris VI, 66651 Banyuls sur Mer, France

Running title: Molecular fingerprintings to measure microbial diversity

Keywords: microbial ecology, 16S rDNA, SSCP, DGGE, TGGE, diversity

\* Corresponding author: E-mail [jean-jacques.godon@ensam.inra.fr](mailto:jean-jacques.godon@ensam.inra.fr); Tel. (+33) 4 68 42 51 54; Fax. (+33) 4 68 42 51 60

### Summary

The exact extent of microbial diversity remains unknowable. Nevertheless, fingerprinting patterns (DGE, SSCP) provide an image of a microbial ecosystem and contain diversity data. We generated by numerical simulation fingerprinting patterns based on three types of distribution (uniform, geometric and lognormal) with a range of units from 10 to 500,000. Firstly, simulated patterns containing a diversity of around 1,000 units or more gave patterns similar to those obtained in experiments. Secondly, the number of bands or peaks saturated quickly to about 35 and was unrelated to the degree of diversity. Finally, assuming lognormal distribution, we used the estimator of diversity proposed by Curtis (Curtis et al., 2002) on *in-silico* and experimental fingerprinting patterns. Results on *in-silico* patterns corresponded to the simulation inputs. Diversity results in experimental patterns were in the same range as those obtained from the same DNA sample in molecular inventories. Thus, fingerprinting patterns contain extractable data about diversity though not on the basis of a number of bands or peaks, as is generally assumed to be the case.

## Introduction

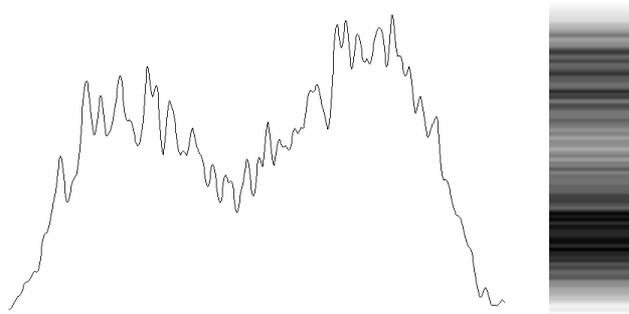
The estimation of microbial diversity, used here in the sense of species richness, remains a challenge for microbiologists (Hughes et al., 2001, Cases and de Lorenzo, 2002, Curtis and Sloan, 2004). New genetic techniques have revealed extensive microbial diversity that has previously gone undetected with culture-dependent methods (Pace, 1997). Inventories and fingerprinting pattern analysis (DGE, SSCP) based on 16S rDNA sequences are widely used in microbial ecology studies. Unfortunately, exhaustive inventories still remain impractical since only a tiny fraction can be analysed (Dunbar et al., 2002). Consequently, the exact extent of diversity remains unknown. Despite this limitation, several mathematical methods have been proposed and compared as a way of estimating diversity based on inventory data (Hughes et al., 2001, Dunbar et al., 2002, Martin, 2002, Kemp and Aller, 2004). In a different way, fingerprinting patterns, due to the size of the analysed fraction, can be considered as an 'image' of the whole microbial ecosystem free of inventory limitation. Such a picture of the bacterial community is given by discrete bands or peaks which emerge from the signal sub-band or sub-peak background. Discrete bands or peaks have been associated to numerically dominant sequences whereas the sub-band or sub-peak background has been considered as coming from a large number of numerically sub-dominant (rare) sequences, and generally omitted from the analysis (Nakatsu et al., 2000, Fromin et al., 2002). From these images, discrete bands or peaks are applied to estimate dynamics and diversities (Muyzer and Smalla, 1998), assuming that each band or peak refers to a unique sequence called a phylotype, ribotype or OTU. Co-migrating bands or peaks have been anticipated depending on the breadth of the operational frame and the range of the microbial diversity (Schmalenberger and Tebbe, 2003). Co-migrating events have been authoritatively described (Kowalchuk and Stephen, 2001, Schmalenberger and Tebbe, 2003) but are generally considered as 'bad luck'.

Though based on the same upstream molecular techniques (DNA extraction, PCR), generally using 16S rDNA genes, the results of molecular inventories of microbial ecosystems give different estimates of diversity when compared to the results derived from fingerprinting methods (Diez et al., 2001). Based on a small number of clones analysed (Kemp and Aller, 2004), molecular inventories present a large diversity with a low level of dominance and numerous singletons. In contrast, the images generated from a large number of 16S rDNA molecules in fingerprinting patterns have been analysed as presenting a high level of dominance. Statistical bias has generally been evoked to explain this discrepancy but comparisons have rarely been carried out. The first goal of this study was to simulate fingerprinting patterns reflecting known data in accordance with high diversity as found in molecular inventories. The second objective was to verify if data on microbial diversity can be extracted from fingerprinting patterns using estimators such as those used for molecular inventories (Curtis et al., 2002).

## **Results**

### *Construction of in-silico fingerprinting patterns*

The general assumption about fingerprinting patterns is that: (i) visible units correspond to dominant units ; (ii) without visible units, high diversity generates a strong background. The simulation with 5,000 different phylotypes (called units in the simulation) is shown in Figure II.2-1. Surprisingly, the *in-silico* pattern did not only give a strong background but also visible units (band or peak) to the number of about 35 which was notably less than the 5,000 expected. Thus, in this case, all discrete units (peak or band) correspond to the sum of several units. Moreover, fingerprinting patterns containing discrete bands or peaks were compatible with very high diversity in the sample.

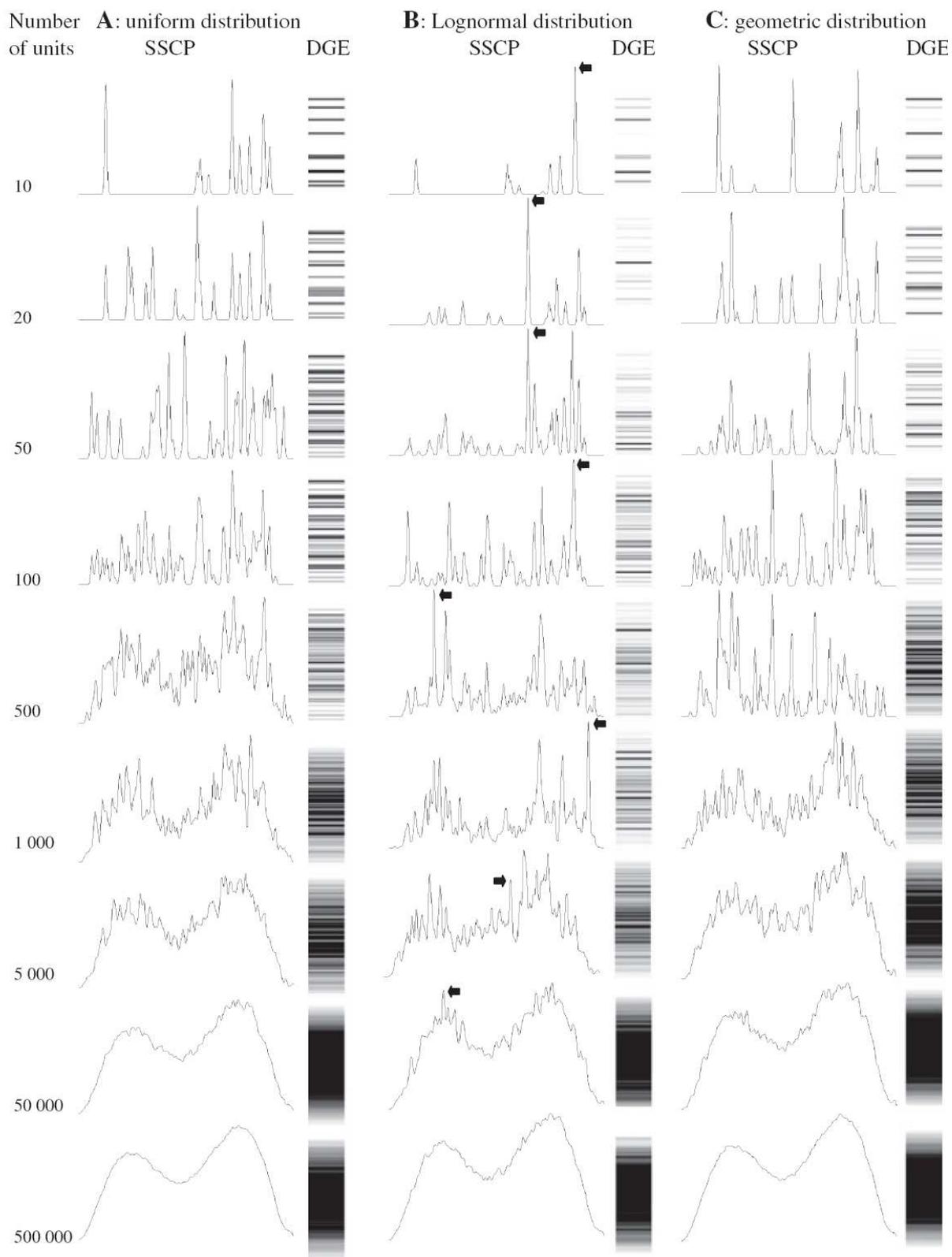


**Figure II.2-1 : Simulated SSCP pattern based on 5,000 units following a bimodal and uniform distribution law**

*Simulated SSCP pattern based on 5,000 units following a bimodal and uniform distribution law; and simulated DGE pattern based on 5,000 units following a unimodal and uniform distribution law. Each species had Gaussian variance and a uniform random magnitude between 0 and 1. Based on observation from experimental patterns, two modes of distribution for the unit's position were used: unimodal distribution for the DGE pattern and bimodal distribution for the SSCP pattern.*

*Patterns generated by the variation of the number of unit based on uniform distribution*

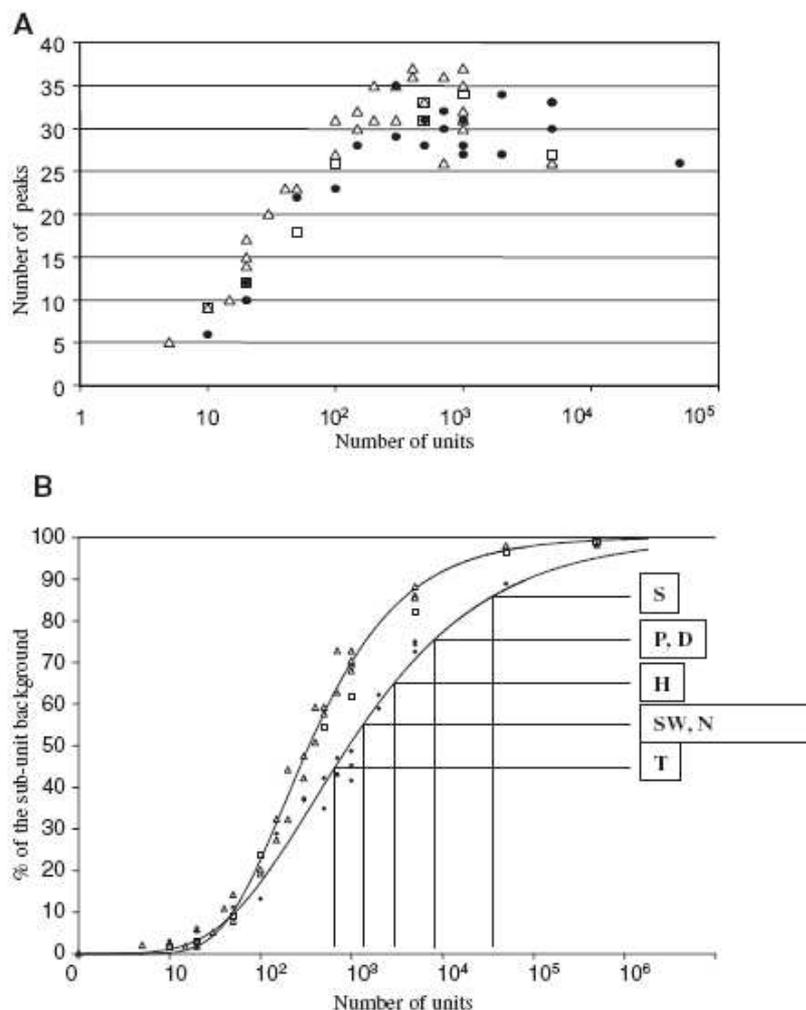
The exact extent of the microbial diversity remained unknown. To make up for this missing data, variations in the number of units from 5 to 500,000 were simulated. Figure II.2-2 presents the SSCP and DGE patterns obtained.



**Figure II.2-2: Simulated SSCP and DGE patterns.**

(A) Uniform distribution; (B) lognormal distribution; (C) geometric distribution. For lognormal distribution the position of the most abundant unit is indicated by an arrow.

The simulation confirmed the previous results: the number of bands or peaks stabilised rapidly around 35 when the number of units increased. Figure II.2-3A presents the number of bands or peaks versus the number of units. Very quickly, the number of bands or peaks is less than the real number of units. Thus, the number of bands or peaks is clearly not usually a measure of the diversity. Except in the case of an obvious dominance of a low number of units, the visible diversity rapidly becomes a function of the size of the reading window and the number of units (variance of the Gaussian curve).

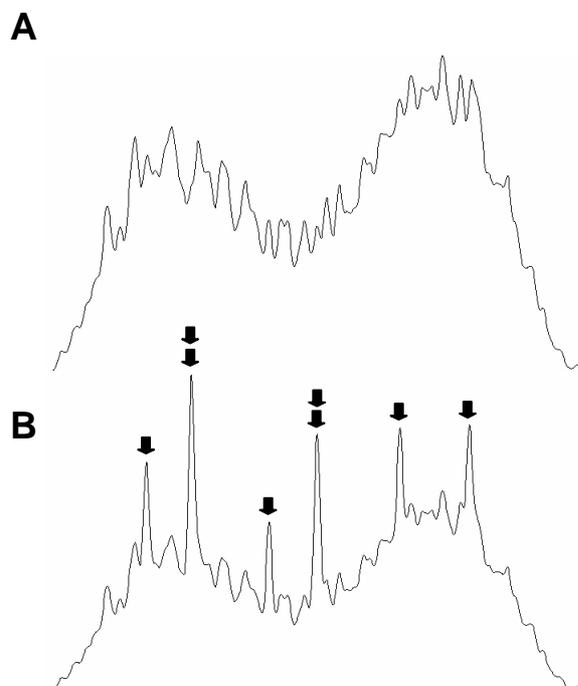


**Figure II.2-3 : Number of peaks and background area as depending on number of units**

(A) Number of peaks on simulated SSCP patterns versus the number of units. Uniform distribution is indicated by white triangles, lognormal distribution is indicated by black dots, geometric distribution is indicated by white squares. (B) Percentage of the sub-unit background (area under the peaks) on simulated SSCP patterns versus the number of units. Simulation values obtained from uniform distribution are indicated by white triangles, simulation values obtained from lognormal distribution are indicated by black dots, simulation values obtained from geometric distribution are indicated by white squares. A Gompertz curve joins the uniform and lognormal simulation value. Dotted lines indicate the percentage of the sub-unit background measured from experimental samples (Fig. 5 and Table 2). S, P, D, H, SW, N, T correspond respectively to soil, pig slurry, anaerobic digester, human feces, sea water, lab-scale nitrification reactor, tick.

*Addition of dominants*

Even if in some cases diversity may be composed of only a large number of numerically subdominant species (Zhou et al., 2002), the above simulated results should only be considered as an example. Indeed, it is obvious that the distribution of the diversity in a real microbial ecosystem is not 5,000 phylotypes with a uniform random magnitude between 0 and 1. Experimental results obtained by molecular inventory have shown that the number of rare phylotypes represents a large fraction (79%) but not the totality of the phylotypes (Kemp and Aller, 2004). Moreover 1% was previously considered as the abundance limit for DGGE detection (Fromin et al., 2002). As an example, figure 4 shows two patterns with 4,600 and 4,608 units. On the 4,608 unit pattern, eight dominant units representing 8% of the signal were added to a pattern with 4,600 sub-dominant units. These units had an amplitude of: 40, 40, 50, 50, 50, 50, 60 and 60 and random abscises of : 314, 379, 141, 594, 205, 498, 382 and 205. The remaining 4,600 subdominant units represent 92% of the signal. Added units corresponded to dominant visible peaks with two co-migrations due to the random abscises (Figure II.2-4) but some other visible peaks corresponded to the sum of sub-dominants units.

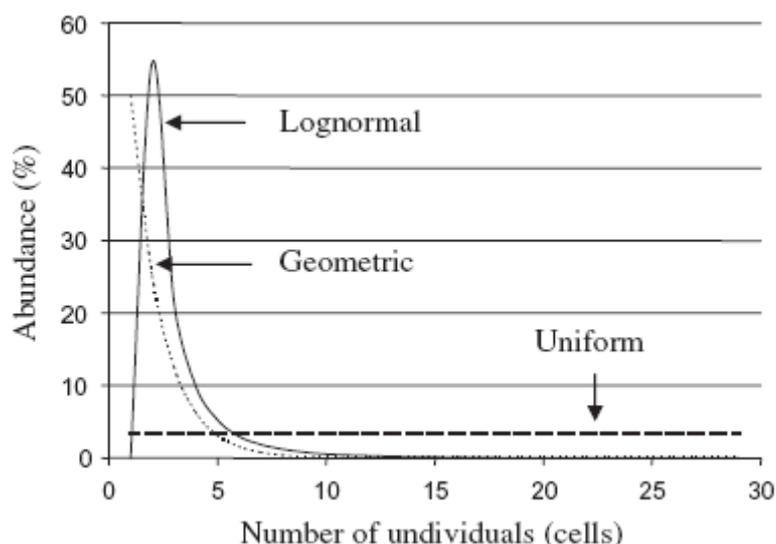


**Figure II.2-4 : Simulated SSCP pattern with a few very dominant units**

(A) simulated SSCP pattern, 100% is from 4,600 units following a bimodal and uniform distribution law; (B) simulated SSCP pattern, 92% of the pattern is constituted by 4,600 units following a bimodal and uniform distribution law and 8% of the pattern is constituted by 8 units following a bimodal and uniform distribution law. The position of these 8 units is indicated by arrows.

*Patterns generated by variation in the number of units with log-normal and geometric distribution*

Several different types of distribution have been proposed for describing species abundance in plant, animal and microbial communities (Bell, 2000). Of these, lognormal and geometric distributions have been the most frequently observed in macro-ecosystems (Narang and Dunbar, 2004). Figure II.2-5 compares uniform, geometric and log-normal abundance distribution of theoretical communities having a similar number of individuals. Abundance of rare, median and dominance units is the most notable difference among the curves. Thus, lognormal and geometric types of species distribution were simulated and compared to the uniform type. SSCP and DGE patterns, as a function of the number of units from 5 to 500,000, are presented for log-normal (Fig. 2B) and geometric (Fig. 2C) distribution. For lognormal distribution, the curves were defined to respect the hypothesis of  $N_{min}=1$  (see Experimental Procedures). The same modes of fingerprinting distribution were used : unimodal distribution for the DGE pattern and bimodal distribution for the SSCP. Independently of the distribution, the simulations confirmed the previous results : the number of visible units saturated around 35. The number of visible peaks versus the number of units is presented in figure 3A.



**Figure II.2-5 : Comparison of uniform, geometric or lognormal density law.**

*The three theoretical microbial communities are the same size but display different abundance distribution.*

*Link between signal background and diversity in simulated patterns*

Fingerprinting pattern information can be divided into two parts: peaks or bands and signal sub-peak background. Signal sub-peak background, defined as the part of the signal without visible bands or peaks, formed an important part of the signal in fingerprinting patterns. Clearly, the part of the total signal corresponding to the sub-peak background increases with the diversity (Fig. 3B). Between 50 to 500 units, the signal sub-peak background ratio jumped from 10% to 50%. A very high level of diversity, around 50,000, lead to the absence of visible bands or peaks. The signal was constituted only of a sub-peak background (Fig. 2).

#### *Stability of the fingerprinting pattern*

Fingerprinting patterns were formed either totally (uniform distribution) or partially (geometric or lognormal distribution) by a large number of subdominant units. The stability of the pattern was tested by withdrawing 1/5 of the subdominant units (1,000 units) from a 5,000 unit pattern. This large "extinction" induced only very small changes in fingerprinting patterns, in terms of visible bands or peaks, (data not shown). In fact, such "extinction" had an impact on the pattern only if dominant units were affected in the case of geometric or lognormal distribution. Thus, the stability of fingerprinting patterns needs very careful interpretation: even if the detectable diversity is stable the undetectable diversity might be subject to a great deal of unobservable change.

#### *Distinguishing peaks of unique and non-unique origin*

Distinguishing between the peak fraction and the sub-peak background fraction is not easy. In fact, peak fraction corresponds to peaks formed by one single unit whereas the sub-peak background fraction represents the rest of the signal, including peaks formed by more than one unit. Thus, the ability to distinguish between peaks generated by one or more than one unit is crucial. The measurement of the peak variance can provide a clue. In fact, if one peak is generated by several units (from 2 to  $n$ ) with close but different migration parameters, its variance is larger than a peak generated by one or more units with identical migration parameters (Experimental Procedures).

#### *Measurement of diversity*

In the case of simulations of fingerprinting patterns, the number of visible bands or peaks cannot be used to estimate diversity and the sub-peak background ratio gives only a rough indication of the diversity (Fig. 3B). However, Curtis *et al.* (Curtis et al., 2002) propose a method for estimating the true diversity of prokaryotic communities ( $S_T$ ) by calculating the ratio of two measurable variables : the number of individuals in the sample ( $N_T$ ) and the abundance of those most abundant in the sample ( $N_{max}$ ). These authors made only two assumptions: a lognormal distribution and the abundance of the unique least-abundant species ( $N_{min}$ ) to be 1 (Curtis et al., 2002).

#### *In-silico validation of the diversity measurement*

The Curtis estimator was first applied to lognormal distribution simulating fingerprinting patterns.  $N_T$  are known as the input of simulation and  $N_{max}$  can either be read from input of simulation or measured from the simulated pattern. Thus, two values of the number of phylotype  $S_T$  were obtained: the first, only a calculation, was used to verify the Curtis estimator and the second, a measurement, checked the use of fingerprinting patterns (Table II-1). In both values, the errors vary between 10% to 75% and this discrepancy seems to have come mainly from the estimator not from the measurement.

**Table II-1: Validation of the Curtis estimator for fingerprinting simulation patterns with lognormal distribution**

Input data Lognormal parameters		$N_T$	Calculated value		Measured value	
$S_T$	$\mu, \sigma$		$N_{max}$	$S_T$	$N_{max}$	$S_T$
10	2.25, 1.5	203	89	14	74	16
100	3.25, 1.5	6601	48 6	175	485	175
1000	4.25, 1.5	226 082	12 549	733	10 170	880
10 000	5.35, 1.5	6 472 186	127 311	5604	133 000	5398
100 000	6.85, 1.5	292 790 615	987 613	90 363	740 000	112 689

$S_T$  corresponds to the number of units within an *in-silico* pattern,  $N_T$  corresponds to the number of individuals in the simulation sample,  $N_{max}$  corresponds to the number of individuals in the most frequent units or phylotype

*Experimental validation of the measurement of diversity*

Experimental patterns occurred in a wide variety but the real diversity and distribution remained unknown, in contrast to the *in-silico* pattern. Using the same hypothesis (lognormal distribution,  $N_{min} = 1$  and  $N_T$  known, and  $n_{tot}/n_{max}$  measured from the fingerprinting pattern (see Experimental Procedures), the bacterial diversity can be estimated. Figure II.2-6 presents seven experimental SSCP patterns representing various microbial ecosystems (tick, nitrification reactor, sea water, human feces, pig slurry, anaerobic digester, soil). The patterns were classified on the basis of the sub-peak background ratio. Table II-2 shows diversity results obtained from these seven SSCP patterns based on the Curtis estimator. In five of the seven examples (nitrification reactor, sea water, human feces, pig slurry and anaerobic digester), the results have been compared with those obtained from molecular inventories as an independent source (Godon et al., 1997b, Suau et al., 1999, Snell-Castro et al., 2005); D. Bougard, unpublished; M. Larcher, unpublished) in order to estimate the most abundant members of that community. The definition of a unit in these molecular inventories (OTUs, ribotype, phylotypes) was slightly different: for nitrification digester, sea water, human feces, pig slurry and anaerobic digester respectively either identical correspondence of the 16S rDNA V3 region, RFLP pattern, 98% of 16S rDNA similarity, 97% of 16S rDNA similarity and 97% of 16S rDNA similarity. Around  $N_{max}$ , the lower and upper limits of the binomial confidence interval are indicated, given at 95% confidence level, as also is its impact on  $S_T$  estimation. The number of visible peaks never goes beyond 35, as shown in the *in-silico* patterns. The sub-unit background ratio is also indicated in Table II-2. These experimental values are compared in figure 3B to values obtained with *in-silico* patterns. The comparisons show that the sub-unit background percentage gives an indication of the diversity.

Table II-2: Measurement of bacterial diversity using the Curtis estimator from molecular inventories and SSCP patterns

Microbial ecosystem	Number of bacterial genome in a sample: $N_T^a$	Molecular inventories				SSCP profiles				References
		Number of bacterial sequences analysed	Number of phylotypes <sup>b</sup>	Frequency of the most abundant phylotype <sup>c</sup> $\eta_{max}/\eta_T$	Diversity estimated by phylotype abundance $S_T$	% of the most abundant peak $\eta_{max}/\eta_T$	Diversity estimated by peak abundance $S_T$	Number of peaks	% of the subpeak background	
Tick	$10^5$	nd	nd	nd	nd	13.8%	200	7	46	L. Halos (unpublished)
Lab-scale nitrification reactor	$10^6$	43	21 (V3 region)	$11.8 < \mathbf{23.3} < 38.6\%$	$109 < \mathbf{235} < 550$	8.9%	743	17	55	D. Bougard (unpublished)
Sea water	$10^7$	118	15 (RFLP)	$7.3 < \mathbf{12.7} < 20.1\%$	$512 < \mathbf{958} < 1840$	9.6%	1347	15	56	M. Larcher (unpublished)
Human faeces	$10^7$	284	82 (98%)	$5.2 < \mathbf{8.1} < 11.9\%$	$1040 < \mathbf{1637} < 2628$	5.9%	2003	17	65	Suau <i>et al.</i> (1999)
Pig slurry	$10^7$	202	108 (97%)	$5.4 < \mathbf{8.9} < 13.7\%$	$868 < \mathbf{1470} < 2544$	3.3%	4128	29	75	Snell-Castro <i>et al.</i> (2005)
Anaerobic digester	$10^{8d}$	460	133 (97%)	$3.0 < \mathbf{4.8} < 7.2\%$	$1874 < \mathbf{2855} < 4430$	2.5%	5199	29	74	Godon <i>et al.</i> (1997)
Soil	$10^7$	nd	nd	nd	$7188 < \mathbf{11755} < 19671$	1.2%	9761	31	87	P. Peu (unpublished)

a. Number of bacterial genomes in the sample before PCR amplification.

b. Definition of phylotype in published work indicated in brackets.

c. Measured value is indicated in bold; lower and upper limits of the binomial confidence interval were calculated based on 95% confidence level.

d. Number of bacterial cells in a sample used in the Curtis publication (Curtis *et al.*, 2002).  
nd, not determined.  $S_T$  corresponds to the number of phylotypes within the experimental pattern;  $M_T$  corresponds to the number of individuals in the experimental sample;  $M_{max}$  corresponds to the number of individuals in the most frequent phylotype;  $\eta_{max}/\eta_T$  corresponds to the frequency of the most frequent sequence in molecular inventories or the frequency of the most frequent peak within the SSCP pattern.

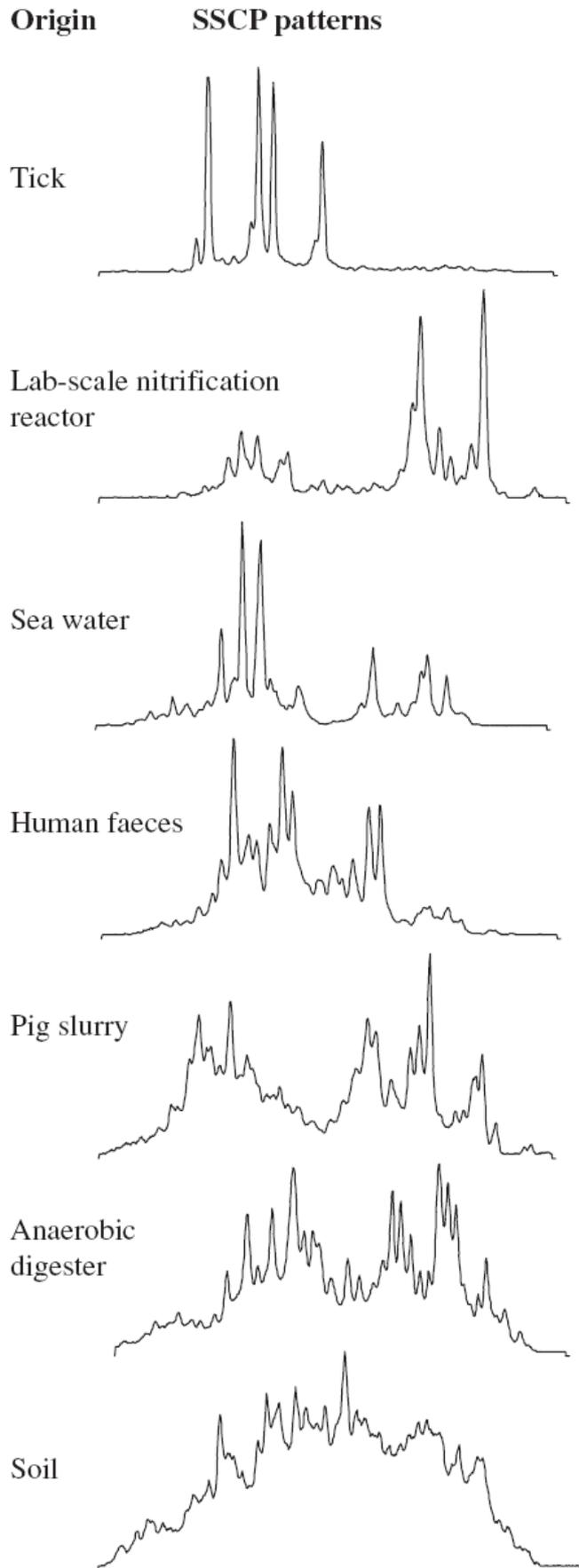
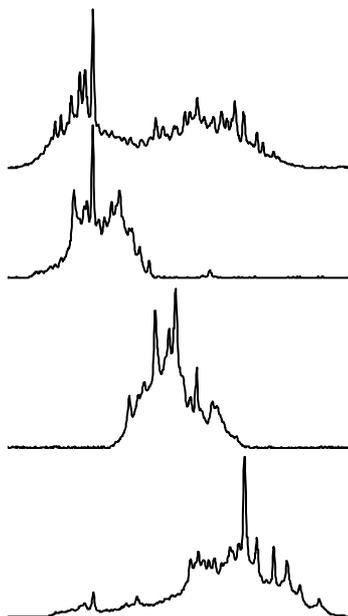


Figure II.2-6 : SSCP patterns from various experimental samples

*Division of total bacterial diversity*

To check the robustness of this measurement, three fractions of the same experimental sample were compared to the measurement of total sample (Figure II.2-7). The three fractions corresponded to three phylogenetic groups of the bacterial kingdom (*Clostridiaceae*, *Lactobacillus-Streptococcus* and *Bacteroides-Prevotella*) (P. Peu, unpublished). The selection was based on specific primer amplification (P. Peu, unpublished). The ratio of each group in the two ecosystems tested, pig slurry and pig feces, was unknown. Thus, the value of 20% for each, used in  $N_T$  value, was arbitrarily chosen but was compatible with published data on both these microbial ecosystems (Leser et al., 2002, Snell-Castro et al., 2005). The results presented in Table II-3 show no major discrepancy between the diversity shown as the sum of the three groups, 6,695 and 8,940, compared with the measurement of the total diversity, 5,543 and 8,257, respectively.



**Figure II.2-7 : SSCP patterns from pig feces sample as composition of various groups**

SSCP patterns from pig feces sample: (A) corresponds to the total bacterial pattern, (B) corresponds to the *Clostridiaceae* group pattern, (C) corresponds to the *Bacteroides-Prevotella* group pattern, (D) corresponds to the *Lactobacillus-Streptococcus* group pattern.

**Table II-3 : Diversity of subgroups of the bacterial diversity in pig feces**

Phylogenetic group	$\tau^*$	Pig slurry sample		Pig feces sample	
		$n_{max}/n_T$	$S_T$	$n_{max}/n_T$	$S_T$
<i>Clostridiacea</i>	2.10 <sup>6</sup>	4.8%	1705	1.7%	4127
<i>Lactobacillus-Streptococcus</i>	2.10 <sup>6</sup>	3.5%	2290	6.5%	1274
<i>Bacteroides-Prevotella</i>	2.10 <sup>6</sup>	2.9%	2700	2.1%	3539
Total of group diversity			6695		8940
Bacteria total	10 <sup>7</sup>	2.4%	5543	1.5%	8257

\*The ratio of each phylogenetic group is arbitrarily defined as 20% of the total bacterial community.  $n_{max}/n_T$  corresponds to the frequency of the most frequent peak within the SSCP pattern.

### Discussion

*Fingerprinting pattern data (DGE, SSCP) have mainly been exploited as discrete bands or peaks in the study of temporal or spatial stability, for identification and even for estimating diversity. The rest of the signal (called sub-band or sub-peak background) has been considered as meaningless. In the present work, computer-based numerical simulations show that fingerprinting patterns contain data about the overall diversity of microbial ecosystems providing information that can be extractable. Thus, possible measurement of the microbial diversity is proposed here based on the Curtis estimator and associated assumptions (Curtis et al., 2002).*

#### Link between visible bands or peaks and diversity

Whatever the distribution (uniform, lognormal and geometric) used in simulation, the number of visible units rapidly reached a maximum. This maximum was around 35 in the conditions of simulation used, which is close to experimental data (Fig. 2 and 3A). This maximum depends on the reading frame as well as on the resolution, which is conditioned by the technical parameters of the method used: here the SSCP method, but easily transposable to the DGE method. Some other fingerprinting techniques such as A-RISA (Ranjard et al., 2001) may enable more units to be seen and can be considered even though the definition of the units (ribosomal intergenic region) differs. In all cases, this asymptotic number is rapidly reached (Fig. 3A). Thus, excepting ecosystems presenting a low number of bands or peaks (below ten), it is clear that in a large majority of cases discrete bands or peaks of fingerprinting patterns cannot be used directly as an estimator of the diversity. This is the first lesson of numerical simulation. The fact that one peak or band may hide more than one rDNA sequence has already been described (Dabert et al., 2005) and sometimes a large number -up to 60- may be hidden (Schmalenberger and Tebbe, 2003) and, thus, never assessed. The second more unexpected lesson of numerical simulation is that high diversity (up 1,000 units) generates patterns which are indeed readable. A very large number of units (more than 50,000) can occur before a pattern appears smeared. For example, very high diversity estimated for two soil samples has been

published: about 3,000 to 8,000 species from Arizona soil (Dunbar et al., 2002) and at least 8,800 species from Norwegian soil (Ovreas and Torsvik, 1998). Both have proved compatible with a readable pattern. Moreover, a band or peak measurement of variance and standard deviation from the Gaussian curve make it possible to discriminate between bands or peaks coming from a single phylotype and those from multiple phylotypes (two or more). Another positive point is that the fingerprinting pattern was different according to the distribution (Fig. 2) and contains information about these data that may be exploitable.

#### Type of microbial distribution

Simulation with uniform distribution gave patterns with visible bands or peaks which do not correspond to real units. This observation does not fit in with the majority of the experimental cases where visible bands or peaks are identified within a complex pattern. The addition of dominant units (around 1%) in a uniform distribution pattern shows clearly the emergence of these units even if they represent only a small fraction of the total (Fig 4). In contrast to uniform distribution, lognormal and geometric distributions present dominant units (Fig. 5) and simulation gave patterns closer to reality. This convergence should enrich the debate about the distribution of species abundance in microbial ecosystems (Curtis et al., 2002, Narang and Dunbar, 2004) and supports the tentative use of lognormal distribution by the Curtis estimator. Moreover, this low level of dominance fits in with evidence from the data of molecular inventories (Kemp and Aller, 2004).

#### *Measurement of diversity from simulated and experimental patterns*

However, simulations of log-normal and geometric distribution patterns are closer to real patterns than are uniform distribution patterns. Within log-normal and geometric distribution patterns most of the dominant peaks or bands correspond to real dominant units, even if 1% is sufficient to be dominant (Fig. 4). Two measurements can be extracted from fingerprinting patterns to estimate microbial diversity. The first is the measurement of the sub-peak area (Fig. 3B). This is only a rough estimate because as the peak number increases, the value rapidly reaches a plateau. The second measurement is based on the Curtis estimator (ratio between the total number of individuals in the community and the abundance of the most abundant members of that community) (Curtis et al., 2002). This estimator, proposed for molecular inventories, requires an assumption of log-normal distribution. This estimator, tested on numerical simulation patterns, refined the simulated diversity (Table 1). From experimental data, the degree of diversity obtained by the Curtis estimator is roughly double that of the SSCP pattern when compared to inventory results (Table 2). This overestimate could be explained in at least two ways. Firstly, by the cut-off used (Acinas et al., 2004a) : in molecular inventories, OTUs, ribotypes or phylotypes have generally been clustered on the basis of 97% similarity whereas the cut-off in fingerprinting is an identical sequence in a short variable region (around 180 bp). For example, in a phosphate-accumulating microbial ecosystem, the number of phylotypes based on the 16S rDNA V3 region is double that based on a 97% similarity (Dabert et al., 2001a). Secondly, by the imprecision of the  $n_{max}$  measurement in molecular inventories as shown by the binomial confidence interval (Table 2) : fingerprinting pattern measurement of diversity gives

results similar to those of a molecular inventory but the actual process is much cheaper and faster. Thus, such pattern measurement could facilitate the rapid comparison of a large set of data. This measurement of diversity should be applicable using all fingerprint methods with continuous (SSCP, DGE) or discrete (A-RISA, T-RFLP (Liu et al., 1997)) unit separation. Though, applicable the measurement should not strictly be comparable due to method-specific definition of the diversity unit (V3 region, ITS, restriction sites). Moreover, the accuracy of the ratio  $n_T/n_{max}$  is assessed taking into account the totality of PCR products and not merely a sub-sample, as in a cloning procedure. As a result, this method is more precise due to the large number of molecules analysed and this precision is proved by the reproducibility of the patterns. The remaining difficulty is the measurement of  $N_T$ , the number of individuals in the sample. Curtis used the estimated number of bacteria in the sample (Curtis et al., 2002), whereas here we have used the estimated number of bacterial genomes prior to PCR amplification (see Experimental Procedures). The number of bacterial genomes in PCR DNA matrices is considered as a final sub-sample of the microbial community. This measurement is 100 times lower than the Curtis value. This discrepancy changed the estimate and the result corresponds roughly to a four-fold division. The variable number and the sequence variation of the 16S rDNA also impaired the results, so suggesting investigation of other DNA sequences (Dahllof et al., 2000). Thus, these approximations, along with the classic PCR bias (Suzuki and Giovannoni, 1996), remain a source of error in estimating  $S_T$ . The other validations, based on measurements from simulated patterns and totalised sub-group diversities, have shown the robustness of the approaches but, also, the relative imprecision of the measurement (Table 1 and 3).

In conclusion, and contrary to molecular inventories, fingerprinting patterns do not reflect only a tiny fraction of reality but correspond to a representation of the whole microbial consortium. Numerical simulation of fingerprinting patterns shows that this picture can be used to estimate microbial diversity but not by reference to the number of visible bands or peaks. Using the Curtis estimator is one possibility for extracting diversity data from fingerprinting patterns. Despite approximations, such estimates are robust, rapid, inexpensive and provide a way of comparing microbial diversity. Moreover, the fact that diversity data is accessible in fingerprinting patterns may enhance methods of estimation. Thus, paradoxically, it may turn out that diversity will be easier to measure in microbial communities than in communities of macro-organisms.

### ***Experimental Procedures***

Definition of terms used

*SSCP: single strand conformation polymorphism*

*DGE : includes fingerprinting methods based on Denatured Gradient Electrophoresis, such as DGGE, TGGE, TTGE*

*Band, peak : correspond respectively to visible elements within experimental or simulated DGE and SSCP patterns*

*Unit : in-silico pattern counterpart of a phylotype from an experimental pattern*

*$S_T$  : number of units or phylotype within in-silico and experimental patterns, respectively*

*$N_T$  : number of individuals in the experimental or simulation sample*

$n_T$ : number of individuals in the cloning sample or SSCP pattern

$N_{max}$  : number of individuals in the most frequent units or phylotype in the experimental or simulation sample

$n_{max}$  : number of individuals in the most frequent units or phylotype in the cloning sample or SSCP pattern

Generation of fingerprinting patterns

Simulated fingerprinting patterns were generated following four parameters: (i) the number of units (corresponding to bacterial phylotype), (ii) the shape of the units (corresponding to gel resolution), (iii) the position of the unit in the pattern (corresponding to condition of migration), (iv) the intensity the units (corresponding to the number of individuals in each phylotype).

The number of units  $S_T$  was carried out in simulation for various values from 10 to 500,000.

As for experimental patterns the shape of each single unit being represented in the pattern by a Gaussian curve function. All units had a constant variance,  $\sigma_0^2$  which corresponds to the experimental measurement of a single SSCP peak. The position of the unit in the pattern was randomly determined according to experimental observations of the size of the window (750 scans) and distribution curve (bimodal for SSCP pattern and unimodal for DGE pattern). The intensity the units within the simulated pattern follow distribution laws (uniform, lognormal and geometric).

Simulated patterns were generated according to the following equation:

$$y = \sum_{i=1}^{S_T} \frac{a_i}{\sigma_0} \Phi\left(\frac{x - b_i}{\sigma_0}\right) \text{ for } x = 1..750$$

where,  $S_T$  is the number of species,  $\Phi$  is a Gaussian-centred unit variance density,  $\sigma_0$  is the standard deviation,  $x$  is the position of the scan.  $i$  is the number of individuals in phylotype,  $a_i$  was derived from a probability density law  $g$ .

For uniform density,  $g$  depends of  $U [0, 2 N_G]$ ,  $g(a) = 1/(2N_G)$

For lognormal density depends of parameters  $\mu$  (mean) and  $\sigma_G^2$  (variance),

$(\log(a_i) \sim N(\mu, \sigma_G^2))$ ,  $(g(a) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_G}} \exp^{-\frac{1}{2\sigma_G^2}(\log(a)-\mu)^2})$ ), the  $\sigma_G$  value is 1.5 and the  $\mu$  values

are, respectively, 2.25, 2.80, 2.80, 3.25, 4.20, 4.75, 5.35, 6.60 and 7.00 for 10, 20, 50, 100, 500, 1000, 5,000, 50,000 and 500,000 units.

For geometric density  $g$  depends of parameter  $p$ ,  $(g(a) = Cp^a)$ .

The position of each peak  $b_i$  was derived from a bimodal probability density law  $f$ :

$f(x) = C\left(\frac{x}{750}\left(1 - \frac{x}{750}\right)\right)^2(0.03 + \left(\frac{x}{750} - 0.475\right)^2)$  for SSCP patterns. The position of each band  $\mu_i$

was derived from a unimodal probability density law  $f : f(x) = C' \frac{x}{750} (1 - \frac{x}{750})$  for DGE patterns.

C and C' were constants of normalisation and x indicates the number of scans.

*Measurement of peak and background areas and identification of true units within a pattern*

True peaks were defined as unit(s) with a similar single migration coefficient (one Gaussian curve) whereas false peaks were defined as units with several migration coefficients (two or more Gaussian curves). True peaks were determined following assumptions from the laws F and G. For our purposes, ten representative points were considered on both sides of a peak. A regression on a linear tendency, added to a Gaussian with unknown variance, was carried out. If the estimate of the variance was equal to or of the same order of magnitude as  $\sigma_0^2$ , the peak was considered to be a single unit. If the estimated variance was definitely larger than  $\sigma_0^2$ , the peak was considered to result from either the contribution of at least two units or from the sum of many sub-dominant units. The highest peak was considered as the most frequent unit. Its abundance within the SSCP pattern was measured as the ratio between the area of the peak and the total area of the pattern.

The estimate of the background signal area was based on the smoothing of a piecewise linear curve which joined the different minima of the SSCP pattern.

*Measurement of the diversity using a Curtis estimator*

The number of species  $S_T$  was estimated following the method of Curtis (Curtis et al., 2002) with the following assumptions : distribution law G was lognormal and the least frequent unit only contained one or at most two units.

The number of individuals in the sample ( $N_T$ ) was either exactly known, as in a simulated pattern (input data), or measured in an experimental pattern. In the latter case,  $N_T$  was approximated as the number of bacterial genomes in the sample prior to PCR amplification. The DNA concentration was estimated by agarose gel electrophoresis and the number of genomes calculated assuming two Mbp per bacterial genome (Button and Robertson, 2001).

The final parameter, the number of individuals in the most frequent units or phylotype ( $N_{max}$ ), was obtained in different ways : (i) in simulated patterns,  $N_{max}$  was exactly known from input data; (ii) in simulated patterns  $N_{max}$  was approximated as

$$N_{max} = \frac{n_{max}}{n_T} N_T$$

(iii) in simulated and experimental patterns,  $N_{max}$  was measured from the pattern and approximated using the same equation.

**Acknowledgements**

We would like to thank P. Dabert and J. Hamelin for helpful discussion. Thanks also to D. Bougard, J. Doré, M. Larcher, P. Lebaron, P. Peu, R. Snell Castro and G. Vourc'h for DNA samples.

### **II.3. Les difficultés d'utilisation de la SSCP**

Parmi les différentes techniques d'empreinte moléculaire, nous avons privilégié la SSCP capillaire. L'outil de base pour étudier les communautés microbiennes par SSCP capillaire est un séquenceur qui est réservé à cet usage dans le laboratoire. Ce séquenceur permet de séparer des fragments d'ADN sur la base de leur conformation secondaire, qui dépend elle-même de leur séquence. Chaque phylotype est caractérisé par une séquence, donc un temps de rétention. Une communauté comportant plusieurs phylotypes est représentée par un profil comportant plusieurs temps de rétention. Jusqu'à récemment, ce profil représentatif de la « diversité » était interprété en le convertissant manuellement en pics présents ou absents en superposant des photos d'écran. Il était également possible d'utiliser le logiciel Genscan® pour convertir individuellement chaque profil en terme d'aire relative et de récapituler ces informations dans un tableau. La correspondance entre l'aire du pic « A » dans le profil N et l'aire du pic « A » dans le profil N+1 fourni par Genscan® se fait alors manuellement ce qui rend la procédure lourde, subjective et soumise à des paramètres peu transparents du logiciel Genscan® pour estimer l'aire des pics.

Les techniques d'empreintes moléculaires permettent par conséquent d'avoir une vision globale de la communauté bactérienne. Le fait que les espèces présentes en faible abondance génèrent également un signal permet d'étudier l'hétérogénéité de la distribution et donc la diversité (un système dominé par une seule espèce sera moins divers qu'un système où les espèces sont réparties de façon homogène). L'indice de Simpson que nous allons brièvement décrire dans le paragraphe suivant permet de rendre compte de cette diversité.

### **II.4. Mesurer la diversité (Simpson) par une empreinte moléculaire**

Comme l'illustre la Figure II.2-3, il n'est pas efficace de compter le nombre de pics pour estimer la richesse lorsque cette richesse est très importante. En effet, même une grande richesse ne peut engendrer qu'un nombre limité de pics. La Figure II.2-3 met cependant en évidence que l'aire sous les pics contient de l'information.

Partant de ces idées de base, Bart Haegeman et Jérôme Hamelin au laboratoire ont simulé un grand nombre de communautés et les empreintes correspondantes afin de déterminer quelle information peut réellement être extraite de profils SSCP complexes comportant une grande aire sous les pics. Leur résultat principal est que la précision de l'estimation de l'indice de Simpson (traduisant la diversité, décrit par l'Équation II.4-1), est fortement améliorée lorsqu'on prend en compte l'aire sous les pics. Remarquons qu'il existe l'index, l'indice et l'indice réciproque de Simpson. Toutes ces quantités se basent sur la somme des carrés des abondances relatives, qui est un petit nombre. Ce petit nombre peut être ramené à un nombre facilement comparable par des moyens différents (division, logarithme dans l'équation Équation II.4-1) ce qui a généré l'indice et l'indice réciproque de Simpson.

Équation II.4-1 : Indice de diversité de Simpson

$$D_{Simpson} = -\ln\left(\sum_{p=1}^S a_p\right)$$

Avec S, le nombre d'espèces

$a_p$ , l'aire relative par rapport à l'aire totale (leur somme n'est donc pas égale à 1)

$D_{Simpson}$ , l'indice de Simpson

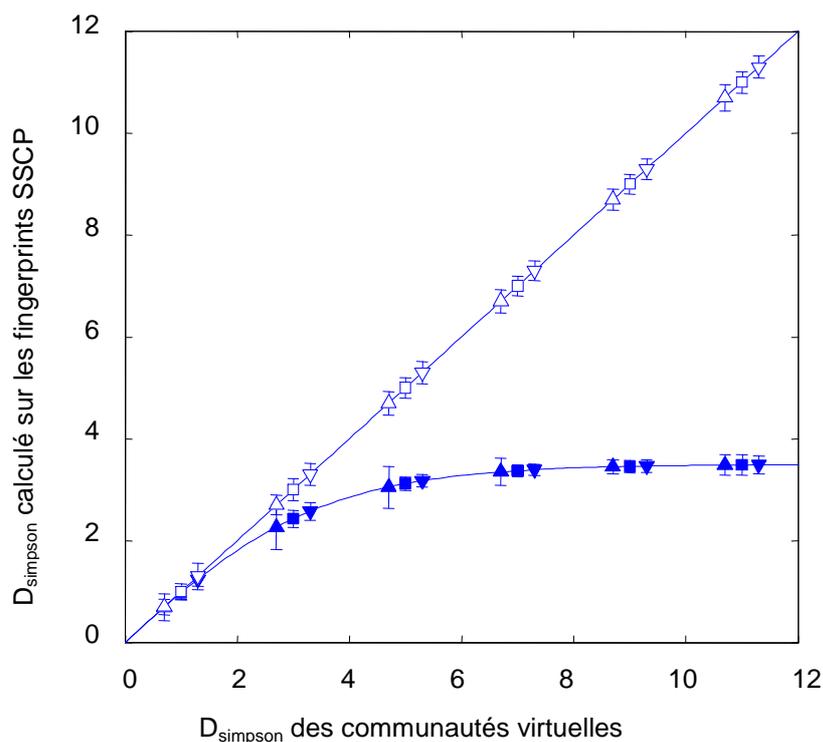


Figure II.4-1 : Indice de Simpson en éliminant l'aire sous les pics (symboles pleins) ou en tenant compte de l'aire sous les pics (symboles creux).

Graphique reproduit avec l'autorisation des auteurs (Hamelin, communication personnelle)

Nous avons vu dans le paragraphe II.1.2 que les empreintes moléculaires sont la résultante de tous les brins d'ADN 16S amplifiés. Si peu d'espèces dominant le système et que l'aire sous les pics est faible, un pic a de grandes chances d'être « pur ». Si au contraire l'aire de background est importante, chaque pic est probablement constitué de plusieurs phylotypes. Il est difficile d'estimer quel pic est pur et quel pic est la résultante de plusieurs phylotypes.

L'indice de Simpson prend en compte l'aire sous les pics. Il est donc utile de disposer d'un logiciel qui permet d'obtenir cette valeur de façon fiable et transparente.

## **II.5. Programme SAFUM utilisé pour l'interprétation des spectres**

SAFUM: Statistical analysis of SSCP fingerprints using PCA projections, dendrograms and diversity estimators.

ZEMB, O<sup>1,2</sup>. HAEGEMAN, B.<sup>1</sup>, LEBARON, P<sup>2</sup>. and GODON, J.J<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>INRA, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, 11100 Narbonne, France

<sup>2</sup>Université Pierre et Marie Curie-Paris6, Paris, F-75005 France; Institut National des Sciences de l'Univers (INSU) CNRS, UMR7621, BP 44, BANYULS-SUR-MER, F-66650 France

**Running title:** a Matlab script to work with SSCP fingerprints

**Keywords:** capillary, SSCP, Fingerprint, Analysis, diversity, microbial

**Submitted to:** *Molecular Ecology Notes*

**Corresponding author:** ZEMB Olivier

Tel: (33) 4 68 42 51 51 (outside France)

FAX: (33) 4 68 42 51 60 (outside France)

Email: zemb.olivier@gmail.com

Abstract

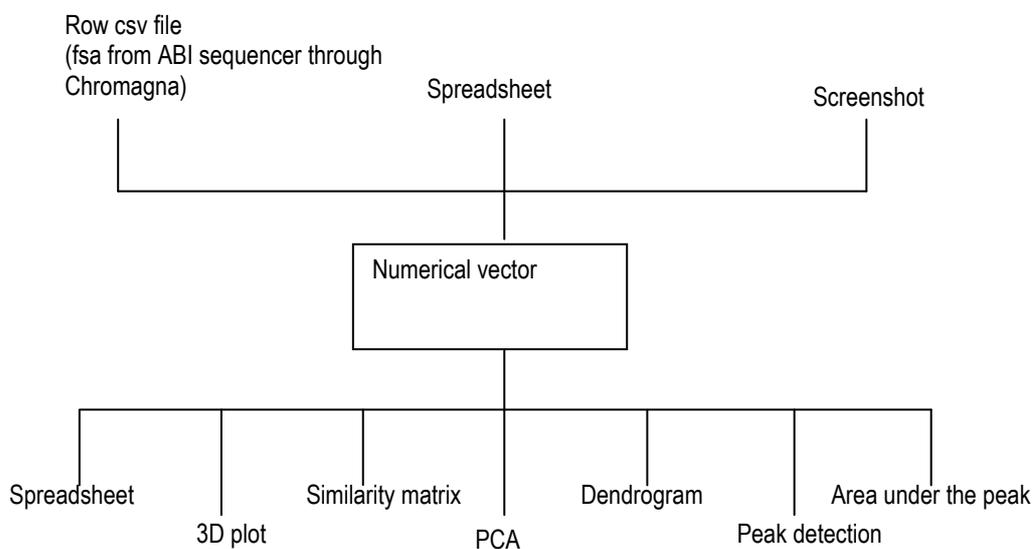
The program SAFUM provides a smart interface to import, visualize and compare fingerprinting data, and especially capillary single strand conformation polymorphism data, in conjunction with a basic statistical analysis tools. It includes principal component analysis, two- or three-dimensional representations, dendrograms based on Euclidean distance, and easily exportable files for subsequent applications. SAFUM is useful for the analysis of spatial or time series of microbial community fingerprints obtained with an ABI prism sequencer.

Molecular methods based on DNA extraction and PCR amplification stand as key steps in molecular microbial ecology studies (Hewson et al., 2006). The PCR product can be analysed by sequencing randomly picked fragments (Lozupone et al., 2006), or by carrying out a differential migration of PCR fragment generating a fingerprint of the community. Capillary Single Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP) is an example of the latter (Delbès et al., 2000), that is technically not so difficult (Sunnucks et al., 2000). The electrophoretic separation is based on differences in secondary structure of single-stranded nucleic acids and corresponding differences in their mobility through a gel. The fragments are detected at the end of the capillary electrophoresis, thus providing a retention profile. An internal standard is analyzed simultaneously so that these profiles can be quantitatively compared each other. Even if the technique is not so difficult, the analysis might be little bit harder since each author has his own empirical method that might not be easily transposable. As many authors use fingerprints (Delbès et al., 2001b, Godon et al., 2001, Dabert et al., 2005, Callon et al., 2006, Hori et al., 2006, Peu et al., 2006), analyses are sometimes unclear, making comparison of data sometimes difficult. A frequent use of these fingerprints makes their manipulation critical. The aim of the software is to allow easy and transparent comparison that is needed to study population reproducibility (Collins et al., 2006, Hoshino et al., 2006, Ranjard et al., 2006b) and activity (Weinbauer et al., 2002, Hewson et al., 2006, Wertz et al., 2006). In order to compare profiles, an automated analysis is convenient and objective. Several commercial packages are available, but do not allow data manipulation beyond pre-programmed algorithms, often expensive and not transparent enough for a satisfactory use in microbial ecology. For example, it was recently demonstrated that the area under the peaks contains information (Loisel et al., 2006). Commercial software's have difficulties to deal with raw data keeping this area into account. An exception is the MEDIMECO Matlab™ (MathWorks) script for fingerprint analysis developed by Harmand et al. (Harmand et al., 2006) but their parameterization requires numerous manipulations and extensive Matlab™ knowledge.

In this note, we present the open-source program SAFUM, also written in Matlab™ but with a graphical user interface. No programming knowledge is required but the purchase of Matlab™ is necessary. Most of the features of MEDIMECO are available and some extended possibilities are accessible. We demonstrate some possibilities of SAFUM on a typical example, by analyzing fingerprints of a semi-continuous anaerobic reactor fed with a mixture of wine and milk operated under stable conditions until day 89 when an organic overload occurred. The organic overload resulted in an acidification of the reactor. After three days, the pH was set back to normal.

The first step consists of importing the profiles from an ABI prism sequencer. SAFUM offers two ways of importing data : graphical data files from a screenshot in the ABI Genescan software, or text data files in Comma-Separated Value (CSV) format from the program CHROMAGNA, software developed by M. J. Miller at NIH (Fekete et al., 2003). A folder can be chosen everywhere on the computer and all the '.csv' files will automatically be selected. SAFUM also provides an alignment algorithm when '.csv' raw data are used as input files. These files should include both sample and internal standard information to be aligned. A reference profile using the ROX400HD (Applied

Biosystems) is included in SAFUM to insure similar alignment for different sets of samples. This reference profile can easily be modified by the user if other ladders are used, replacing the 'roxref.csv' file in SAFUM folder.



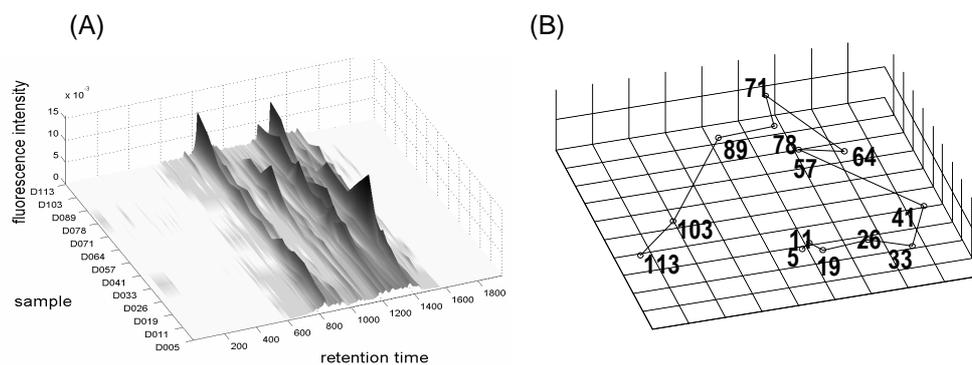
**Figure II.5-1 : Block diagram of SAFUM**

*Block representation of SAFUM structure. The input files can be spreadsheets containing unprocessed signals extracted from fsa files with Chromagna™, spreadsheets with each column containing the fingerprint of one sample or screenshots. The process in SAFUM allows to perform peak detection, Principal component analysis (PCA) and dendrograms. Fingerprints, peak's abscissa, peak's area and area under the peaks in spreadsheets can be exported in spreadsheets.*

The total area generated by the signal can be normalized to one so that relative abundance of each peak can be compared (Brown et al., 2005). All the normalized spectra can be stacked together allowing immediate comparison. The Figure II.5-2A shows some peaks that co-migrate in many samples, and rise or decrease as a function of time. For a set of normalized profiles, the Euclidean distance between two spectra can be computed. This normalized distance is computed taking into account all the data (scans in case of '.csv' input or pixels in case of image input) and not only peak areas as most software's do. The more two profiles mismatch, the bigger this distance. Based on the Euclidean distances, SAFUM computes a corresponding dendrogram with a choice of different methods (for more details see, (Legendre and Legendre, 1998). SAFUM also displays the divergence rate as a function of time in case of temporal series or location in case of spatial gradient explored. In Figure II.5-2B, the two last spectra are different, due to the overloading event happening on day 90 (Zemb, PhD thesis, 2007).

Principal Component Analysis (PCA) summarizes large data sets into a small number of vectors gathering most of the variability, and allows to produce representative plots (Ranjard et al., 2006b). In our case, each SSCP profile is a vector with a large number of variables (typically 1000). PCA looks for linear combinations of these variables, which best represent the variance present in the

data. SAFUM displays the data on the first two or three principal components (called PCA1, PCA2 and PCA3). Simultaneously, the variance present in the projection of the data in these principal components is compared to the total data variance. In this way, the user can judge whether the reduced representation is meaningful. In our example, 74% of the data variance is represented on the first three principal components. Distances between the projected samples were generated with only three fourth of the genetic changes. Nevertheless, Figure II.5-2A shows that the bacterial community of the anaerobic digester evolves in a continuous way, as reported in previous studies (Fernandez et al., 1999, Zumstein et al., 2000). Interestingly, the distance between fingerprints after the perturbation (of day 103 and 113) is much larger than during the stable period.



**Figure II.5-2 : Example of SAFUM's output**

*SSCP spectra from an anaerobic digester under stable operation. (A) Three dimensional view. The retention time (X-Axis) vary between 0 and 2000, the names of the samples contain the number of days after the beginning of the experiment. The area of each fingerprint was normalized to one. B) PCA representation. The first three principal components explain 74% of the variability (42% for PCA1, 21% for PCA2 and 11% for PCA3). Numbers indicate the number of days after the inoculation.*

As described previously (Loisel et al., 2006), the area under the peaks contains some information. To our knowledge, SAFUM is the first software that allows access to this information, which is mostly removed during the data recovery. The peaks areas and area under the peaks can be used for comparison of samples in terms of diversity or species abundance distribution (Hamelin, personal communication).

In conclusion, SAFUM provide a solution for importing data from capillary sequencers to facilitate specific use of fingerprints in microbial ecology. Once data are imported, all steps are transparent and statistical tools like PCA and dendrograms are available through an user-friendly interface. All results are easily exportable in widespread formats.

#### Acknowledgements

We thank Laurent Lardon and Jerome Harmand for their help in the Matlab world, Jerome Hamelin for very helpful discussion. We thank Jerome Hamelin, Nyree West, Jeff Ghiglione, Patrice Rey and Valérie Bru for their suggestions after their use of SAFUM.

**References :**

- Brown MV, Schwalbach MS, Hewson I, Fuhrman JA (2005) Coupling 16S-ITS rDNA clone libraries and automated ribosomal intergenic spacer analysis to show marine microbial diversity: development and application to a time series. *Environmental Microbiology* 7, 1466-1479.
- Callon C, Delbes C, Duthoit F, Montel MC (2006) Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. *Systematic and Applied Microbiology* 29, 172-180.
- Collins G, Mahony T, O'Flaherty V (2006) Stability and reproducibility of low-temperature anaerobic biological wastewater treatment. *Fems Microbiology Ecology* 55, 449-458.
- Dabert P, Delgenes JP, Godon JJ (2005) Monitoring the impact of bioaugmentation on the start up of biological phosphorus removal in a laboratory scale activated sludge ecosystem. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66, 575-588.
- Delbes C, Moletta R, Godon JJ (2000) Monitoring of activity dynamics of an anaerobic digester bacterial community using 16S rRNA polymerase chain reaction - single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology* 2, 506-515.
- Delbes C, Moletta R, Godon J (2001) Bacterial and archaeal 16S rDNA and 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem. *FEMS Microbiol Ecol* 35, 19-26.
- Fekete RA, Miller MJ, Chatteraj DK (2003) Fluorescently labeled oligonucleotide extension: a rapid and quantitative protocol for primer extension. *Biotechniques* 35, 90-+.
- Fernandez A, Huang SY, Seston S, et al. (1999) How stable is stable? Function versus community composition. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3697-3704.
- Godon JJ, Duthoit F, Delbes C, Millet L, Montel MC (2001) Use of molecular fingerprint for the study of complex microbial ecosystem. Application to AOC Salers cheese. *Lait* 81, 257-262.
- Harmand J, Paulou L, Desmoutiers J, et al. (2006) The microbial signature of drinking waters: myth or reality? *Water Science and Technology* 53, 259-266.
- Hewson I, Fuhrman JA (2006) Improved strategy for comparing microbial assemblage fingerprints. *Microbial Ecology* 51, 147-153.
- Hewson I, Steele JA, Capone DG, Fuhrman JA (2006) Temporal and spatial scales of variation in bacterioplankton assemblages of oligotrophic surface waters. *Marine Ecology-Progress Series* 311, 67-77.
- Hori T, Haruta S, Ueno Y, Ishii M, Igarashi Y (2006) Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1623-1630.
- Hoshino T, Terahara T, Yamada K, et al. (2006) Long-term monitoring of the succession of a microbial community in activated sludge from a circulation flush toilet as a closed system. *Fems Microbiology Ecology* 55, 459-470.
- Legendre P, Legendre L (1998) *Numerical ecology*, 2nd English ed.. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

- Loisel P, Harmand J, Zemb O, et al. (2006) Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environmental Microbiology* 8, 720-731.
- Lozupone C, Hamady M, Knight R (2006) UniFrac - An online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. *Bmc Bioinformatics* 7.
- Peu P, Brugere H, Pourcher AM, et al. (2006) Dynamics of a pig slurry microbial community during anaerobic storage and management. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 3578-3585.
- Ranjard L, Lignier L, Chaussod R (2006) Cumulative effects of short-term polymetal contamination on soil bacterial community structure. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1684-1687.
- Sunnucks P, Wilson AC, Beheregaray LB, et al. (2000) SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology* 9, 1699-1710.
- Weinbauer MG, Fritz I, Wenderoth DF, Hofle MG (2002) Simultaneous Extraction from Bacterioplankton of Total RNA and DNA Suitable for Quantitative Structure and Function Analyses. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1082-1087.
- Wertz S, Degrange V, Prosser JI, et al. (2006) Maintenance of soil functioning following erosion of microbial diversity. *Environmental Microbiology* 8, 2162-2169.
- Zumstein E, Moletta R, Godon JJ (2000) Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology* 2, 69-78.

## **II.6. Conclusion de l'usage de la SSCP pour l'étude de consortia complexes**

En conclusion, l'utilisation précise des spectres SSCP sous forme numérique pour caractériser des échantillons complexes est maintenant possible grâce à un programme qui permet d'acquérir et de manipuler les données de façon quantitative. Cette manipulation et l'interprétation sont réalisées sans négliger les phylotypes faiblement abondants. De façon imagée, à trop s'intéresser au roi, on risque d'oublier que le tiers état contribue de façon majeure au fonctionnement de la société.

Pour résumer, la SSCP est :

- 1) Peu coûteuse
- 2) Rapide
- 3) Robuste et reproductible malgré tous les biais
- 4) Applicable en haut débit (96 échantillons par jour sur un séquenceur 4 capillaires)
- 5) semi - quantitative, car elle permet de comparer des abondances *relatives entre échantillons*
- 6) compatible avec l'usage spécifique en écologie microbienne par l'usage de SAFUM

La SSCP figure de ce fait parmi les techniques de choix pour l'étude des communautés microbiennes et va probablement faire l'objet de modélisation dans les années à venir. Cette modélisation de la migration des brins dans un gel devrait permettre de tirer plus d'informations de migrations réalisées dans des conditions différentes (Laffay, communication personnelle).

La SSCP est par conséquent un outil particulièrement adapté pour suivre l'évolution d'un inoculum complexe. Les chapitres suivants utilisent cette technique pour caractériser de manière fine des écosystèmes microbiens complexes.

Le chapitre suivant utilise la SSCP pour caractériser des consortia contrastés de bactéries hétérotrophes marines soumis à un contact temporaire de toluène. Dans ce cadre, la SSCP permet d'avoir une vision complète de la communauté microbienne avant et après le choc. Le milieu marin permet de prélever des communautés ayant des histoires contrastées sélectionnant des communautés différentes.

## CHAPITRE III : Résilience d'un consortium marin soumis à un choc de toluène

<b>III.1. INTRODUCTION.....</b>	<b>90</b>
III.1.1. PRELIMINAIRE	
III.1.2. LE CONSORTIUM DES BACTERIES HETEROTROPHES DU MILIEU MARIN	
<b>III.2. CONTEXTE EXPERIMENTAL DU MILIEU MARIN.....</b>	<b>93</b>
III.2.1. PRELEVEMENTS DE COMMUNAUTES AUX « HISTOIRES » CONTRASTEES	
III.2.2. UN CHOC TRANSITOIRE DE TOLUENE EST ADAPTE POUR ETUDIER LA RESILIENCE DU MILIEU MARIN	
III.2.3. LES CULTURES CONTINUES DE BACTERIES MARINES EN CHEMOSTAT	
III.2.4. SCHEMA EXPERIMENTAL TESTANT LA RESILIENCE DU BACTERIOPLANCTON MARIN	
<b>III.3. ARTICLE: ALTEROMONAS SP. IS A KEY SPECIES FOR RESILIENCE OF CARBON MINERALIZATION IN TWO DIFFERENT SEAWATER BACTERIAL COMMUNITIES WITH CONTRASTING HISTORY.....</b>	<b>105</b>
<b>III.4. RESULTATS COMPLEMENTAIRES ET DISCUSSION.....</b>	<b>122</b>
III.4.1. LIMITATION DU CONTEXTE DE L'ETUDE	
III.4.2. VARIATION DU VOLUME CELLULAIRE DANS NOS CHEMOSTATS SANS PREDATEURS	
III.4.3. LA REPRODUCTIBILITE DE LA SURPRODUCTION APRES UN CHOC TOLUENE	
<b>III.5. DIFFERENCES DE COMPOSITIONS ENTRE SOLA ET MOLA.....</b>	<b>127</b>
<b>III.6. DIFFERENCES D'HISTOIRES ENTRE SOLA ET MOLA.....</b>	<b>128</b>
<b>III.7. CONCLUSION QUANT A LA RESILIENCE DU BACTERIOPLANCTON MARIN.....</b>	<b>131</b>
<b>III.8. DEVELOPPEMENTS POTENTIELS DU MODELE « MILIEU MARIN ».....</b>	<b>132</b>

## **III.1. Introduction**

### **III.1.1. Préliminaire**

Nous souhaitons évaluer dans quelle mesure l'histoire de l'écosystème affecte les mécanismes de résilience après un choc. Pour répondre à cette question, nous avons prélevé deux communautés bactériennes dans l'environnement marin, dont la localisation *in situ* (près des côtes en surface ou au large à 80 mètres de profondeur) permet d'affirmer que les événements perçus par les communautés ont été différents. Ces deux communautés sont potentiellement différentes au niveau de la structure, de la richesse et des propriétés de croissance. Dans ce chapitre, nous allons donner quelques éléments concernant les communautés bactériennes marines hétérotrophes qui permettent de comprendre pourquoi la résilience de ces communautés est particulièrement intéressante. Nous allons ensuite préciser le contexte expérimental (description des chemostats et du choc toluène) avant de présenter nos résultats sous forme d'article. Quelques résultats complémentaires seront ensuite présentés et discutés avant de conclure sur l'apport de ces expériences en chemostat quant à l'étude de la résilience fonctionnelle en milieu marin.

### **III.1.2. Le consortium des bactéries hétérotrophes du milieu marin**

#### *III.1.2.1. L'organisation du flux de carbone dans la colonne d'eau*

Les travaux des années 70-80 ont mis en évidence de fortes abondances de bactéries dans les océans (entre 1 et 10 millions de bactéries par millilitre (Azam, 1983), c'est-à-dire mille fois moins que dans les digesteurs anaérobies qui comportent environ un milliard de bactéries par millilitre p). Ces bactéries utilisent la matière organique provenant en grande partie du phytoplancton par mort cellulaire ou exsudation. Elles sont elles-mêmes une source de nourriture pour des flagellés, eux-mêmes assimilés par des organismes zooplanctoniques : il y a donc une véritable boucle microbienne (Azam, 1983) connectée à la chaîne trophique linéaire (phyto-, zoo-plancton et poissons) (Figure III.1-1). De par la biomasse que représentent les bactéries dans les écosystèmes marins et leur implication dans la chaîne trophique, ces organismes constituent un maillon clé du cycle du carbone (Azam, 1998). L'utilisation des outils issus de la biologie moléculaire pour l'étude de la diversité des bactéries marines a permis de révéler une très forte diversité bactérienne dans l'eau de mer (Giovannoni et al., 1990) et ainsi d'ouvrir la « boîte noire » que constituait jusqu'alors le compartiment microbien.

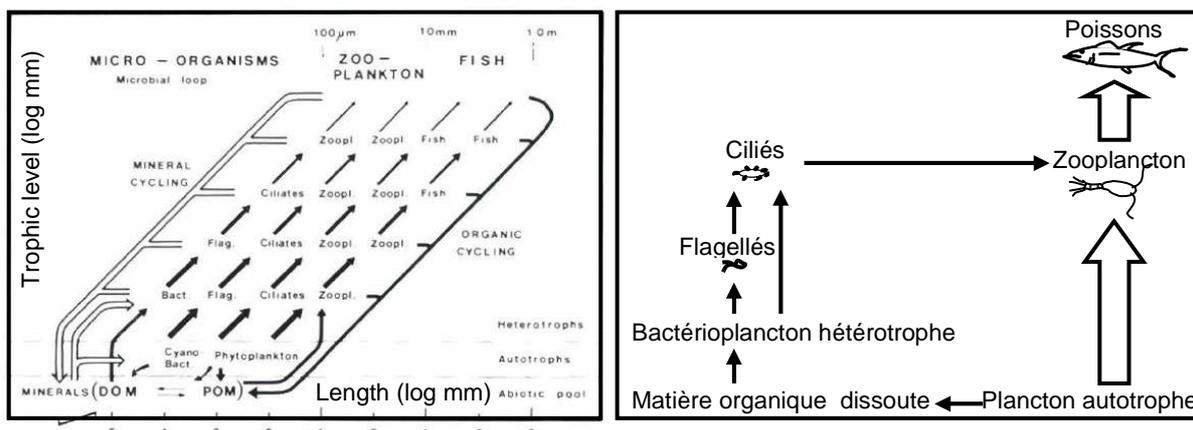


Figure III.1-1 : La chaîne alimentaire et la boucle microbienne dans le milieu marin (Azam, 1983)

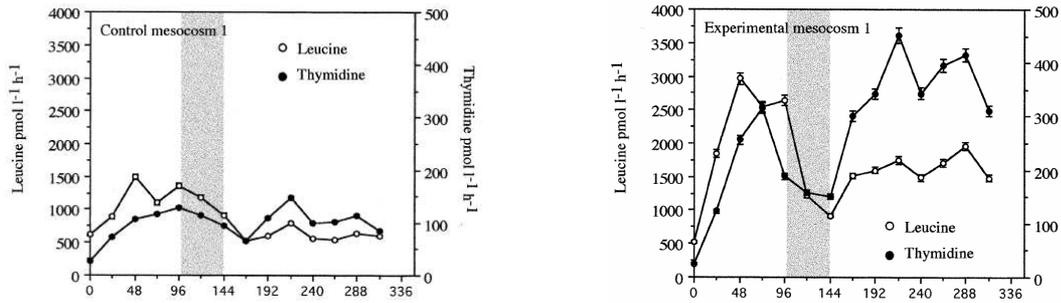
A gauche, le schéma original de Azam et al. (1983) ; A droite, un schéma simplifié de la boucle microbienne (petites flèches) qui permet de réintroduire la matière organique dans la chaîne alimentaire (grosses flèches)

### III.1.2.2. Le flux de carbone, une des « fonctions » du milieu marin

Le consortium bactérien accomplit un certain nombre de transformations chimiques. Ce consortium présente une grande diversité, puisque certaines bactéries peuvent convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique (phototrophie), tandis que d'autres (les hétérotrophes) excellent dans la conversion d'énergie chimique (chimiotrophie). Plusieurs « fonctions » sont en partie des conséquences de l'activité microbienne, comme par exemple la fixation d'azote (Zehr et al., 1995), la conversion de matière organique en  $\text{CO}_2$  par respiration ou le stockage de matière organique dans le compartiment intracellulaire par production de biomasse (Cole et al., 2000, Biddanda et al., 2001, Buesing and Marxsen, 2005b).

La transformation de matière organique dissoute en biomasse bactérienne conditionne l'importance de la boucle microbienne dans le recyclage de la matière organique dissoute. Cette mesure d'activité a fait l'objet de développements techniques importants ces dernières années via la maîtrise de l'incorporation de substrats radiomarqués comme la leucine ou la thymidine (Servais and Lavandier, 1995, Bird, 1999, Buesing and Marxsen, 2005b). L'utilisation de leucine radiomarquée est aujourd'hui bien établie parce que la synthèse de biomasse bactérienne nécessite dix fois plus de leucine que de thymidine (Riemann and Bell, 1990) et que la leucine représente environ 1% des acides aminés des protéines, qui représentent elles-mêmes une fraction constante du carbone intracellulaire (Simon and Azam, 1989).

Plusieurs auteurs ont étudié le changement d'activité par incorporation de leucine radioactive en cas de changement des conditions environnementales (Lebaron et al., 2001b, Shi et al., 2002, Rajapaksha et al., 2004, Tobor-Kaplon et al., 2006a). Il a été montré que l'incorporation de leucine augmente fortement dans des mésocosmes où des nutriments inorganiques sont ajoutés et dans lesquels la production primaire est stimulée (Lebaron et al., 2001b).



**Figure III.1-2 : Augmentation de la production bactérienne dans des mésocosmes (Lebaron et al., 2001b)**

L'incorporation de leucine (ronds vides) et de thymidine (ronds pleins) dans des mésocosmes sans enrichissement (à gauche) et enrichis en nutriments inorganiques :  $\text{NaNO}_3$  ( $5.1 \mu\text{M}$ ),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $1.8 \mu\text{M}$ ) and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $0.6 \mu\text{M}$ ).

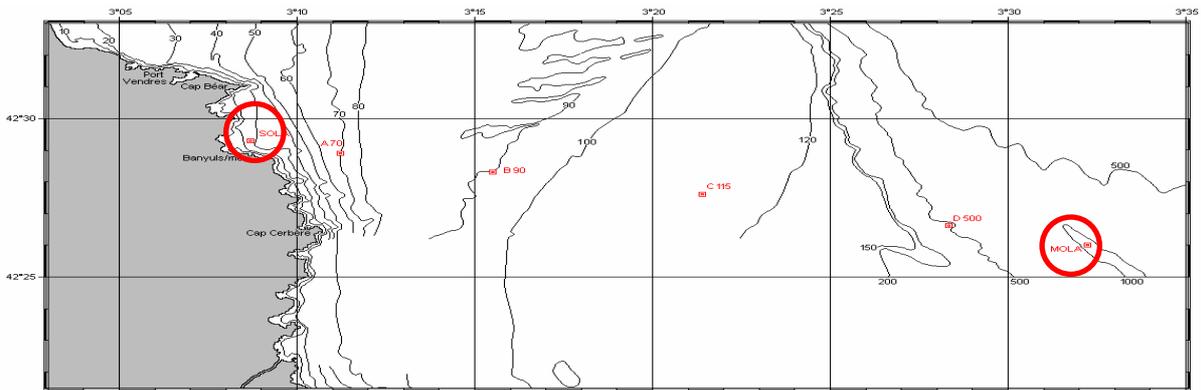
Six points nous ont amenés à utiliser une communauté bactérienne planctonique pour étudier la résilience:

- elle présente peu de rémanence des espèces dormantes (« dilution »)
- elle peut être étudiée sans assembler artificiellement un petit nombre d'espèces
- elle ne présente pas de micro-niches car les bactéries sont libres dans un milieu homogène à l'échelle du prélèvement
- elle est quantifiable par des méthodes analytiques très fiables comme la cytométrie
- le flux de carbone qui est respiré ou incorporé en biomasse est mesurable par des analyses chimiques précises et couramment utilisées
- des structures différentes peuvent être prélevées le long d'un large gradient environnemental et étudiées en environnement contrôlé, ce que nous présentons dans le prochain paragraphe. En effet, il est désormais bien établi que les conditions environnementales sont des déterminants majeurs de la structure des communautés bactériennes : celle-ci dépend des variations climatiques annuelles (Fuhrman et al., 2006) et elle est souvent structurée le long de larges gradients environnementaux comme l'illustre par exemple la Figure III.5-1 (Schauer et al., 2000, Hewson and Fuhrman, 2004 , Ghiglione et al., 2005 ). Nous avons utilisé cette propriété pour prélever deux communautés de structure et d'histoire différentes, et inoculer un dispositif expérimental que nous allons détailler maintenant.

## **III.2. Contexte expérimental du milieu marin**

### **III.2.1. Prélèvements de communautés aux « histoires » contrastées**

Nous avons prélevé les communautés bactériennes libres de deux environnements contrastés : l'environnement littoral et l'environnement du large.



**Figure III.2-1 : Sites de prélèvement des communautés du littoral et du large**

Les communautés du littoral ont été prélevées au point SOLA. Les communautés du large ont été prélevées au point MOLA. Les variations de structure observées entre ces deux communautés sont représentées sur la Figure III.5-1. Pour estimer la résilience de ces deux communautés, nous avons utilisé une exposition temporaire au toluène. Ce choc a été choisi pour les raisons qui sont décrites dans le paragraphe suivant.

L'eau a été filtrée sur des filtres GF/F (rétention nominale de 0.8  $\mu\text{m}$ ). Les bactéries attachées aux particules ont ainsi été éliminées tandis que le filtrat contenant les bactéries libres (i.e. planctoniques au sens strict) a servi d'inoculum pour les chemostats. Du toluène a été ajouté à ces chemostats pour provoquer un choc transitoire et étudier la résilience des communautés bactériennes marines hétérotrophes « libres ».

### **III.2.2. Un choc transitoire de toluène est adapté pour étudier la résilience du milieu marin**

Dans le milieu marin, les chocs aux hydrocarbures ont fait l'objet d'une attention particulière. Beaucoup de souches bactériennes isolées de l'environnement sont capables de dégrader un hydrocarbure en induisant des changements d'expression de gènes plasmidiques (Rasool et al., 2003). Ainsi, lors d'une exposition d'une communauté complexe aux hydrocarbures, certaines souches sont capables de mettre à profit cet apport de matière organique. Cependant, pour une grande partie de la communauté microbienne, l'hydrocarbure peut être toxique.

Lors de l'exposition au pétrole d'une communauté phytoplanctonique, bactérioplanctonique et zooplanctonique, la production des organismes autotrophes diminue alors que de la matière

organique est libérée et que la pression de broutage est réduite (lyse du zooplancton). Cette abondance des ressources combinée à l'absence de prédateurs permet au bactérioplancton hétérotrophe de se développer de façon importante (Nayar et al., 2005). Dans cette expérience, les communautés sont exposées à un ensemble d'hydrocarbures, ce qui est un avantage pour prédire les effets d'une contamination similaire, mais qui est gênant pour un choc que l'on désire modéliser. Parmi les hydrocarbures, le toluène est particulièrement intéressant en tant que modèle comme nous allons le détailler maintenant.

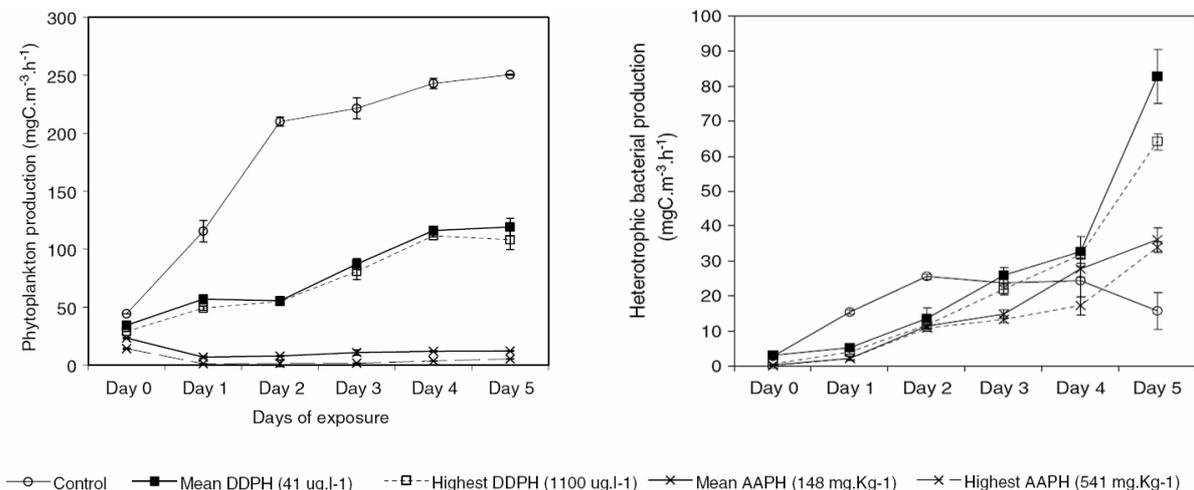
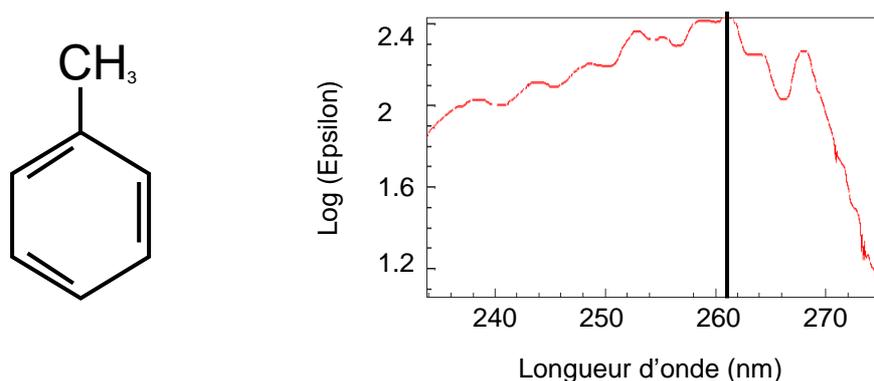


Figure III.2-2 : Exposition d'une communauté marine au diesel (Nayar et al., 2005)

DDPH, Dissolved or Dispersed Petroleum Hydrocarbons ; AAPH, Absorbed or Adsorbed Petroleum Hydrocarbons

En effet, le toluène est un hydrocarbure très réactif en raison de sa structure chimique (Figure III.2-3): il est utilisé pour produire du benzène, pour élever l'indice d'octane dans les carburants mais aussi pour servir de solvant dans les peintures ou de produit de base pour la synthèse du caoutchouc. Le relargage des industries américaines a été estimé à 87000 tonnes par an par l'agence de protection environnementale des Etats-Unis. Il est utilisé en « chimie verte » dans tous les cas où la méthylation ne perturbe pas la réactivité. Il remplace le benzène à chaque fois que c'est possible car il en partage beaucoup de caractéristiques sans en avoir la toxicité. En effet, l'institut national de recherche et de sécurité (INRS) préconise une limite d'exposition de 1 ppm (soit 3,25 mg m<sup>-3</sup>) pour le benzène et 100 ppm (soit 375 mg m<sup>-3</sup>) pour le toluène.



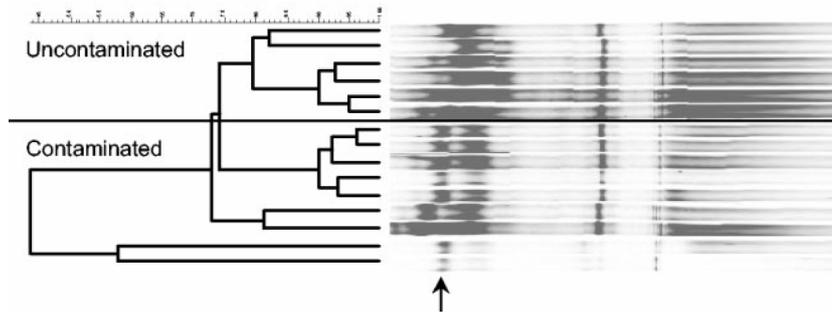
**Figure III.2-3 : Structure chimique et spectre d'adsorption du toluène**

Le spectre d'adsorption du toluène provient de <http://webbook.nist.gov/>. La barre représente 261 nm (longueur d'onde d'excitation utilisée pour la détection du toluène par fluorimétrie, cf. article).

Le toluène est soluble de manière notable dans l'eau de mer (0.38 g/L à 20°C), ce qui le rend actif sur toutes les bactéries libres. Il comporte un noyau aromatique, ce qui le rend détectable par fluorimétrie utilisant une excitation UV (Figure III.2-3). De plus, le toluène est moins dense que l'eau et il est volatil, ce qui rend possible son élimination indépendamment de sa biodégradation. Le toluène est par conséquent un moyen simple et contrôlable d'application d'un choc transitoire qui affecte potentiellement toutes les bactéries libres.

Le toluène diminue le rendement bactérien (Isken and de Bont, 1998, Isken et al., 1999) et réduit la capacité métabolique de certaines souches : par exemple, l'ATP synthase est moins exprimée dans *Pseudomonas Putida* (Volkers et al., 2006) et la dégradation de certains composés spécifiques comme le méthyl bromide est inhibée par le toluène (Goodwin et al., 2005). La dégradation du toluène dépend des autres substrats disponibles dans le milieu (An et al., 2004). Cependant, ces modifications d'expression ne sont visibles que lorsque la concentration de toluène est faible. Lorsqu'elle est forte, le toluène perméabilise les membranes cellulaires et du matériel intracellulaire (i.e. protéines, ARN) est libéré dans le milieu (Jackson and DeMoss, 1965, Sikkema et al., 1994, Sikkema et al., 1995).

Enfin, il a été montré récemment que des communautés complexes ont une diversité accrue de *tmoA* (gène codant pour une enzyme impliquée dans la dégradation du toluène) lorsqu'elles sont exposées au toluène (Hendrickx et al., 2005, Hendrickx et al., 2006). Cela suggère que des réorganisations géniques sont à l'œuvre. Notons toutefois que la distinction des sites contaminés et des sites non contaminés par cette méthode n'est pas parfaite et que certains gènes de dégradation sont véhiculés indépendamment des pollutions.



**Figure III.2-4 : réaction de la diversité du gène *tmoA* au passage d'une contamination de toluène**

Profils DGGE de gènes *tmoA* séparés par le coefficient de Pearson par un dendrogramme construit avec la méthode UPGMA.

Un choc au toluène nous a semblé adapté pour étudier la résilience sur le consortium de bactéries marines pour quatre raisons :

- il est partiellement soluble dans l'eau
- il est possible de soustraire le toluène en excès du milieu par soutirage (car il est moins dense que l'eau et forme une phase à la surface) et celui dissous par renouvellement de l'atmosphère (car il est volatil)
- il est possible de vérifier qu'il ne reste plus de toluène dans le milieu car il comporte un cycle aromatique qui absorbe les UV, ce qui permet un dosage sans traitement (Figure III.3-1)
- La réaction de souches pures et de communautés exposées au toluène est documentée

En conclusion, certains événements ont la capacité d'agir sur la diversité microbienne en influençant les propriétés de croissance de chaque population ou en modifiant l'abondance relative des espèces. Or la résilience peut dépendre de l'abondance et des propriétés de croissance de quelques espèces clés (Griffiths et al., 2004).

Le milieu marin est adapté pour étudier les mécanismes de résilience fonctionnelle car il est possible d'évaluer précisément la division cellulaire (par cytométrie), l'incorporation de biomasse (par incorporation de leucine) et la structure de la communauté (par SSCP). De plus, il est possible de prélever dans l'environnement des communautés avec des histoires contrastées. Ces constatations sont à la base des plans d'expériences que nous avons menées pour étudier des populations microbiennes après un choc contrôlé.

L'étude de la résilience des communautés marines après un choc au toluène se fera sur une durée plus longue que le temps d'épuisement des substrats, et il est par conséquent utile de limiter l'épuisement de substrat en alimentant le consortium de façon continue.

### **III.2.3. Les cultures continues de bactéries marines en chemostat**

#### *III.2.3.1. Les inconvénients des enceintes fermées non alimentées*

Beaucoup d'études sont réalisées dans des enceintes fermées sans apport de nutriments (batch). Bien qu'étant faciles à réaliser, ces systèmes comportent deux faiblesses majeures :

- 1) les substrats du milieu s'épuisent au cours du temps. L'identification des causes de changement d'espèce est difficile à cause de ce changement des conditions physico-chimiques.
- 2) l'absence de renouvellement de la culture restreint les possibilités d'échantillonnage à moins d'utiliser des enceintes de très grand volume, qui sont peu pratiques.

Afin de pallier ces inconvénients, nous avons réalisé notre étude en chemostat continu. Dans les paragraphes suivants, nous allons décrire ces chemostats continus et expliquer la raison de certains choix techniques. La culture continue, après avoir été utilisée dans les années 1950 est moins utilisée depuis quelques décennies, notamment à cause de la faible représentativité des bactéries cultivables dans le milieu marin. De fait, beaucoup d'études utilisant les outils moléculaires tentent de s'affranchir de toute étape de culture. Cependant, les avantages de la culture continue que nous allons décrire dans le paragraphe suivant fait qu'elle est à nouveau de plus en plus utilisée (Hoskisson and Hobbs, 2005).

#### *III.2.3.2. Les avantages des chemostats continus*

Les cultures continues pallient les deux inconvénients cités précédemment et offrent :

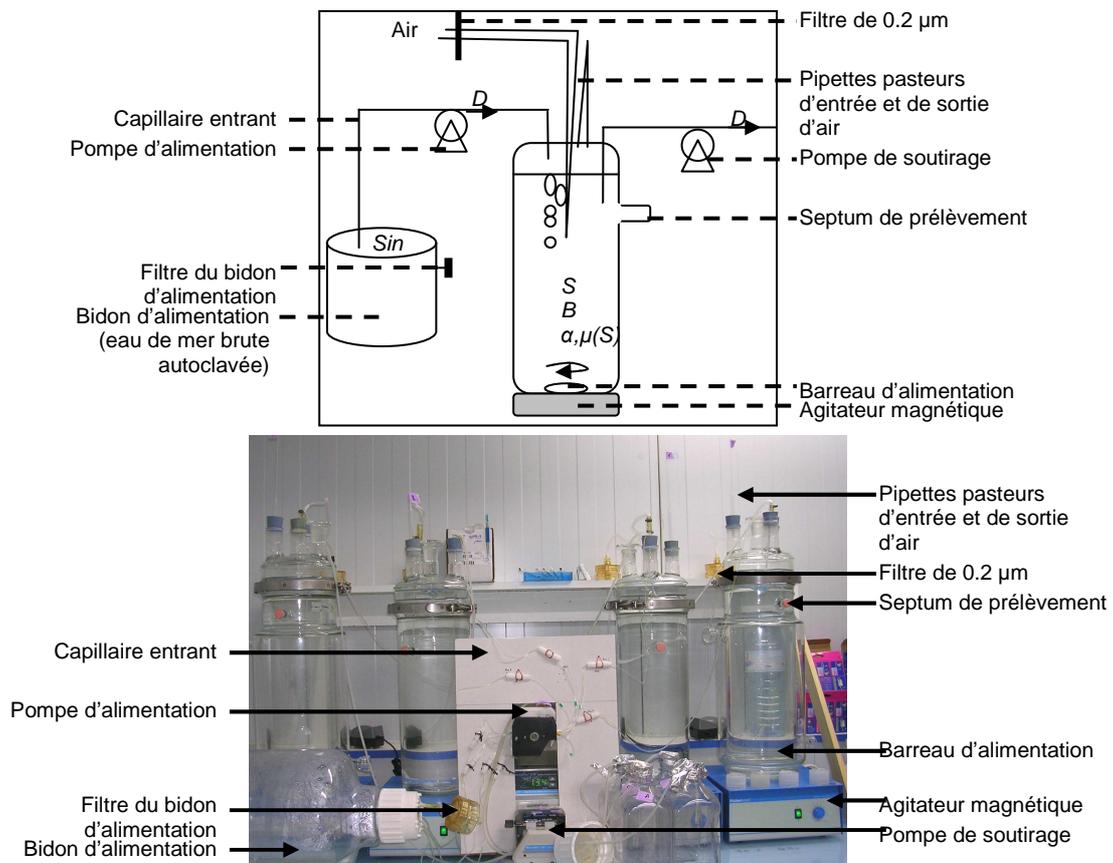
- 1) un environnement physico-chimique homogène, modulable selon la solution nutritive et le débit de la pompe d'entrée,
- 2) la possibilité de prélèvements importants tout en limitant l'utilisation de grands volumes peu pratiques d'un point de vue expérimental,
- 3) Un réglage possible du temps de séjour hydraulique (et donc la possibilité d'évacuer les populations microbiennes inactives ou au contraire de conserver ces populations inactives)

#### *III.2.3.3. Description du dispositif de chemostat continu*

Les chemostats ont un volume de 7,5 litres. De l'air filtré sur 0.2 $\mu$ m est diffusé dans l'enceinte au moyen d'une pipette pasteur stérile reliée à une pompe d'air. L'air est ensuite évacué au moyen d'une autre pipette pasteur stérile. Le milieu est agité par un agitateur magnétique puissant [dimensionné sur 25 litres] (Figure III.2-5). Les quatre chemostats sont identiques et reliés à la même réserve d'alimentation.

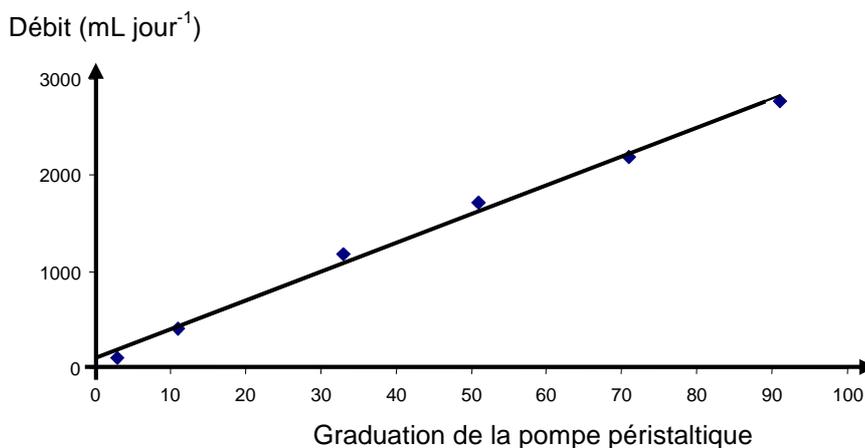
Les prélèvements de petits volumes (de 1 à 10 mL) se font par une dérivation placée sur le côté de l'enceinte. Cette dérivation se termine par un septum (le volume minimal permettant de prélever des petits échantillons par le septum est de 5.5 L). Le septum est commode pour prélever ces petits volumes à des heures précises de façon aseptique. Les prélèvements de grands volumes (i.e. 100-300 mL) sont effectués en arrêtant la pompe de soutirage pendant une dizaine d'heures, de sorte que le niveau monte au dessus du tuyau de soutirage. La pompe de soutirage est alors utilisée

avec un fort débit et l'eau est collectée dans des bouteilles stériles, comme indiqué sur la Figure III.2-5.



**Figure III.2-5 : Schéma d'un chemostat continu et photo des quatre chemostats inoculés avec un consortium de bactéries marines hétérotrophes.**

Une pompe capillaire permettant une alimentation continue est couplée à une pompe de soutirage, une agitation magnétique et une pipette pasteur diffusant de l'air stérile (filtré sur 0.2 µm).



**Figure III.2-6 : Débit de la pompe capillaire alimentant les chemostats continus**

La pompe capillaire utilisée pour l'alimentation fournit un débit entre 30 et 3000 mL par jour. Le débit est proportionnel au réglage de la pompe :  $Y=30 X+91.6$  ( $R^2=0.9948$ )

Le bidon d'alimentation contient de l'eau de mer autoclavée pendant deux heures à 110°C. Ce bidon est muni de quatre capillaires (alimentant les quatre chemostats) et d'une entrée d'air munie d'un filtre 0.2 µm. La pompe d'entrée est une pompe capillaire pouvant fournir jusqu'à 2500 mL/jour (Figure III.2-6). La pompe de sortie est une pompe péristaltique « Masterflex » (Bioblock, Montpellier) au débit légèrement supérieur. Le tuyau de sortie maintient le niveau d'eau en deçà d'un seuil dans les chemostats (niveau de soutirage). Notons que pour des chemostats de petit volume, il est plus précis de réaliser un montage en U. Il peut être muni d'un minuteur pour alterner les phases de marche et d'arrêt. Cette précaution permet de limiter l'usure des tuyaux.

L'ensemble du dispositif est situé dans une chambre à 16°C comme indiqué sur la Figure III.2-5.

Pour remplir ce dispositif, l'eau de mer a été filtrée sur des filtres « GF/F » de rétention nominale 0.8 µm. Les chemostats ont été rincés trois fois avant remplissage.

#### III.2.3.4. Remarque sur le choix du débit

Le choix du taux de dilution (et par conséquent du débit) est crucial. Cependant, il faut garder à l'esprit que le chemostat régule lui-même sa biomasse de façon simple. Ainsi, considérons la communauté complexe de micro-organismes comme une biomasse pouvant croître à une certaine vitesse et prenons le modèle classiquement utilisé (Smith and Waltman, 1995, Grover, 1997) :

#### Équation III.2-1 : Equation d'une biomasse dans un chemostat continu

$$\frac{dB}{dt} = \mu(S)B - DB$$

$$\frac{dS}{dt} = -\alpha\mu(S)B + D(S_{in} - S)$$

où  $B$  est la concentration de biomasse complexe dans le chemostat en  $g L^{-1}$

$S$  est la concentration de substrat dans le chemostat en  $g L^{-1}$

$S_{in}$  est la concentration de substrat dans l'alimentation en  $g L^{-1}$

$D$  est le taux de dilution en  $jours^{-1}$

$\mu(S)$  est la fonction de croissance de la biomasse en  $jours^{-1}$

$\alpha$  est le taux de conversion du substrat vers la biomasse (ou rendement bactérien)

$t$  est le temps en jours

Notons que les unités ne sont pas importantes en tant que telles, mais qu'elles doivent être homogènes. Par exemple, si la biomasse est exprimée en  $\mu g L^{-1}$ , le substrat devra également être exprimé en  $\mu g L^{-1}$ . La même remarque s'applique pour le temps.

Pour obtenir l'équilibre de la biomasse (ie  $dB/dt=0$ ), on voit immédiatement qu'il faut que la biomasse produite soit égale à la biomasse évacuée par dilution. Pour une biomasse non nulle, cela revient à un taux de croissance égal au taux de dilution (Équation III.2-2):

Équation III.2-2 : Condition d'équilibre de la biomasse pour un modèle simple de chemostat

$$\frac{dB}{dt} = 0 \Leftrightarrow \mu(S) = D$$

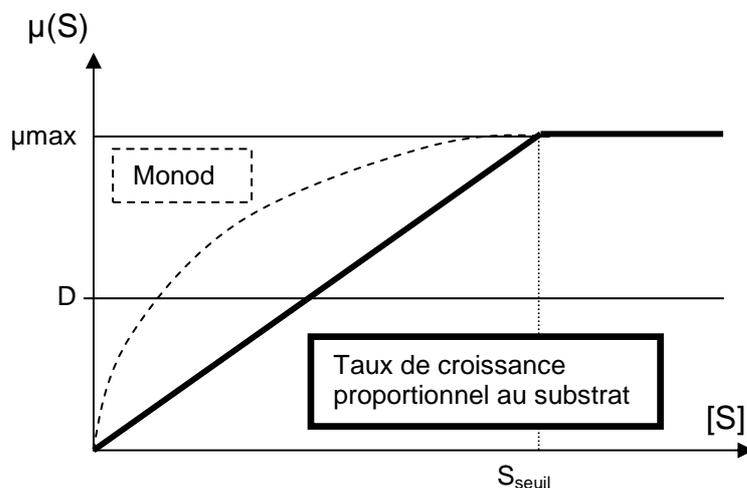


Figure III.2-7 : Fonction de croissance  $\mu(S)$

La croissance bactérienne varie en fonction du substrat ( $S$ ). La fonction de croissance  $\mu(S)$  décrit la dépendance du taux de croissance par rapport au substrat. Cette fonction peut avoir différentes formes. L'hypothèse la plus simple est d'estimer que le taux de croissance est proportionnel au substrat jusqu'à un certain seuil. Ainsi, pour  $S < S_{\text{seuil}}$ :  $\mu(S) = a S$  (trait plein); Une autre fonction de croissance classiquement utilisée est celle de Monod:  $\mu(S) = \mu_{\text{max}} S / (K_s + S)$  où  $\mu_{\text{max}}$  représente le taux de croissance maximal lorsque le substrat n'est pas limitant et  $K_s$  la concentration en substrat pour laquelle la vitesse de croissance est égale à la moitié de la vitesse maximale.

D'après la figure ci-dessus, le taux de dilution  $D$  impose un taux de croissance (qui est unique si la fonction  $\mu(S)$  est croissante), qui détermine la concentration de biomasse dans le chemostat selon ce modèle simple ci-dessous.

Équation III.2-3 : Conséquence d'un taux de croissance imposé

$$\frac{dS}{dt} = 0 \Leftrightarrow -\alpha \mu(S) B + \mu(S) (S_{\text{in}} - S) = 0 \Leftrightarrow B = (S_{\text{in}} - S) / \alpha$$

Si on considère la communauté complexe de micro-organismes comme un consortium caractérisé par un certain taux de croissance qui varie de façon monotone par rapport au substrat, imposer un débit aura pour conséquence de fixer une biomasse. La concentration de biomasse dans le chemostat sera supérieure à zéro si  $D < \mu_{\text{max}}$ . En d'autres termes, tant que le taux de dilution est inférieur au taux de croissance maximal des micro-organismes, de la biomasse sera maintenue dans le chemostat.

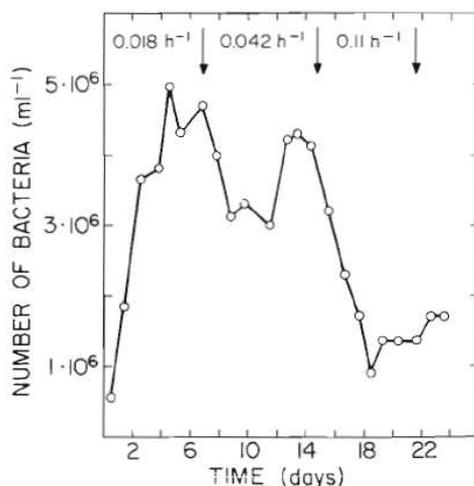
Si on considère la communauté complexe comme une somme de populations indépendantes, les populations à faible taux de croissance seront lessivées au profit des populations à croissance rapide (exclusion compétitive). L'exclusion sera d'autant plus rapide que l'écart entre les taux de

croissance sera grand et que le débit sera élevé. Pour l'étude de consortia marins, nous avons choisi un temps de résidence de 20 jours. Le lessivage des populations à croissance lente est ainsi limité. De plus, nous appliquons le choc au bout de 13 jours seulement. Ainsi, une population qui ne croît pas verra son abondance initiale divisée par 1.6. Nous limitons de ce fait les effets d'exclusion compétitive. Le débit fixe par conséquent le temps de séjour hydraulique. Cependant, la biomasse présente dans le chemostat dépend évidemment de la concentration en substrat limitant dans la solution nutritive. Nous allons apporter quelques précisions quant à ce substrat limitant dans le paragraphe suivant.

### III.2.3.5. Remarques sur le substrat limitant

Une étude séminale réalisée dans l'institut des ressources marines en 1984 a permis de mieux caractériser la croissance du bactérioplancton en cultures non alimentées (Ammerman et al., 1984) et en culture continue (Hagstroem et al., 1984). En particulier, les cultures non alimentées ont montré qu'il y avait suffisamment de nutriments pour synthétiser  $2 \cdot 10^6$  bactéries par millilitre (à comparer avec une densité moyenne entre  $10^5$  et  $10^6$  bactéries par ml mesurée *in situ*). Les cultures continues ont montré qu'il était possible de maintenir la croissance bactérienne sur de longues périodes en alimentant les cultures avec de l'eau de mer filtrée (Figure III.2-8). Cela est cohérent avec l'idée qu'un substrat présent dans la fraction libre devient limitant dans les cultures non alimentées. Dans ces chemostats, toutes les bactéries ne sont pas homogènes comme le montre le temps de génération de ces bactéries qui varie de 9 à 39h.

Ces substrats sont présents dans la fraction dissoute, qui est définie pour les biologistes comme l'ensemble des objets inférieurs à  $0.2 \mu\text{m}$  de diamètre. Ainsi, les molécules dans les compartiments cellulaires font partie de la fraction particulaire. Lors de la lyse des membranes cellulaires (par autoclavage par exemple), ces substrats « cellulaires » s'accumulent dans la fraction dissoute.



**Figure III.2-8 : Culture continue de bactéries marines avec de l'eau de mer filtrée (Hagstroem et al., 1984)**

Le nombre de bactéries marines dans un chemostat alimenté de façon continue par la matière organique contenue dans la fraction dissoute de l'eau de mer. Les taux de dilution sont indiqués en  $h^{-1}$

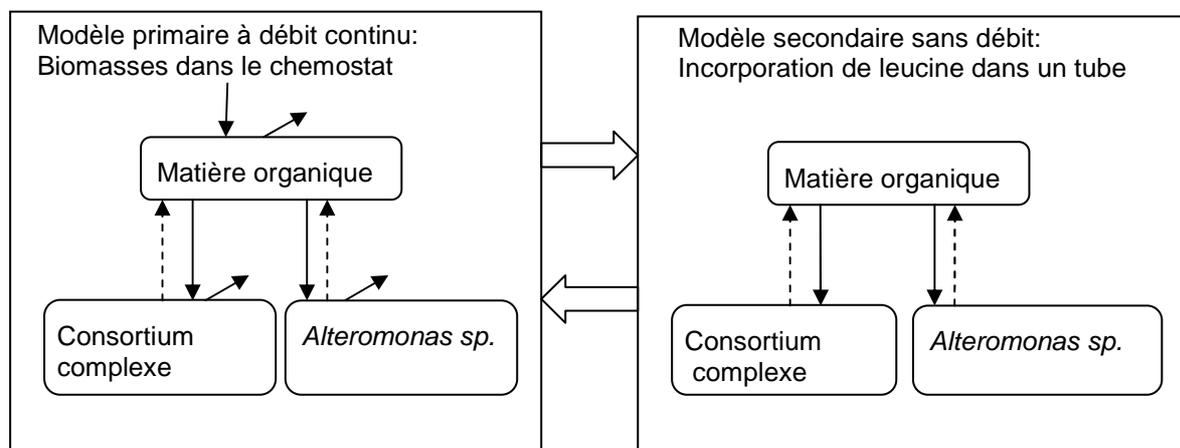
Remarquons que l'identité du substrat limitant n'est pas déterminée. Dans la mer méditerranéenne la limitation peut être soit le carbone organique, soit le phosphore (Thingstad et al., 1998, Zohary et al., 2005, Pinhassi et al., 2006).

En conclusion, les chemostats sont des outils très adaptés pour étudier le système des communautés microbiennes marines hétérotrophes en milieu contrôlé. Le fait d'être en milieu contrôlé permet d'intégrer les différentes mesures (production bactérienne, densité, taille cellulaire) dans une représentation générale. Cette représentation est d'autant plus intéressante qu'elle est quantitative, en particulier lorsqu'un choc survient.

### III.2.3.6. Intégrer les mesures quantitativement dans un modèle

Un modèle simple permet d'intégrer ces différentes mesures dans une représentation quantitative des phénomènes simples, en admettant un certain nombre d'hypothèses à propos des lois de croissance des micro-organismes. Bien que ces hypothèses soient souvent extrêmement simples devant la complexité du vivant, elles permettent néanmoins d'analyser dans quelle mesure les dynamiques observées peuvent être expliquées de façon simple.

Les mesures de densité bactériennes, d'incorporation de leucine et de contenu cellulaire de carbone ont été examinées quantitativement à l'aide de deux modèles couplés (Figure III.2-9). Ces deux modèles basés sur des équations différentielles permettent d'assembler et d'étudier quantitativement les phénomènes de lyse et d'assimilation du substrat limitant. Par exemple, l'effet lytique du toluène pendant l'incubation n'est pas négligé.



**Figure III.2-9 : Modélisation des chemostats marins intégrant les différentes mesures**

Deux modèles basés sur des flux de carbone décrits par des équations différentielles ont été créés pour relier les observations d'abondance, de composition, de contenu cellulaire de carbone et de production. Les flux de matière du substrat de matière organique en biomasse ont été implémentés avec des fonctions de croissance linéaires. Le toluène est modélisé comme un agent toxique provoquant la lyse cellulaire et la libération de matière organique dans le milieu (flèches pointillées). Dans le modèle primaire, tous les compartiments ont un flux sortant à cause de l'évacuation par le débit du chemostat. Le modèle secondaire permet de tenir compte de ce phénomène de lyse qui se poursuit pendant l'incubation avec le substrat radioactif.

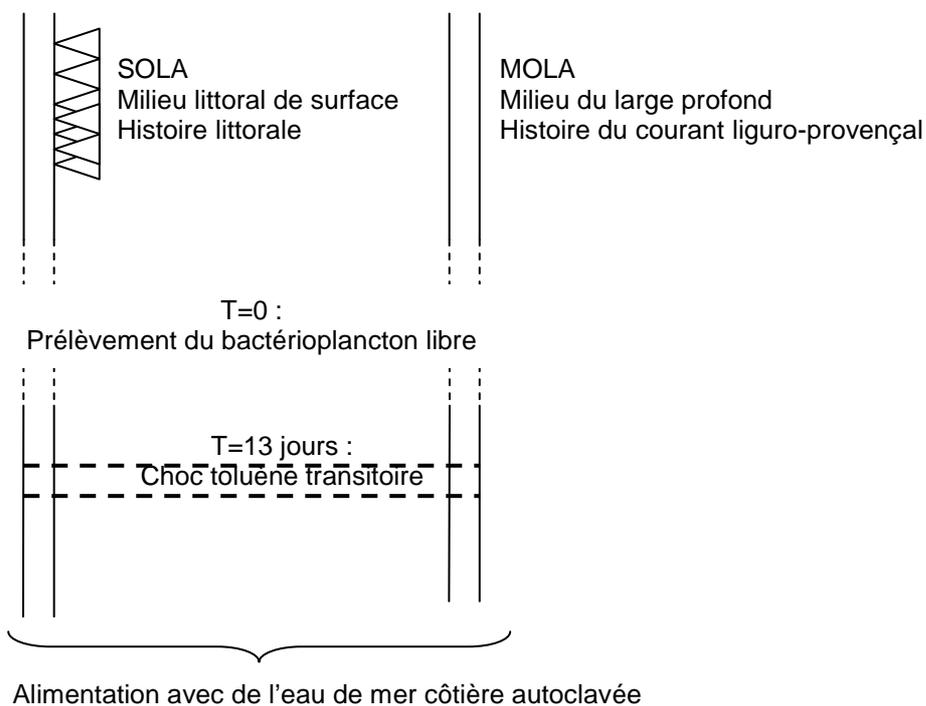
<p><b>Modèle primaire : biomasses dans le chemostat</b></p> $dBt/dt = (\mu_a(T) \cdot S - D - \beta_a \cdot T) \cdot Ba + (\mu_c(T) \cdot S - D - \beta_c \cdot T) \cdot Bc$ <p><i>dBt/dt : Variation de biomasse</i></p> <p><math>\mu_a(T) \cdot S \cdot Ba</math> : croissance de la biomasse d'Alteromonas</p> <p><math>(-D - \beta_a \cdot T) \cdot Ba</math> : élimination de la biomasse d'Alteromonas par dilution et par lyse à cause du toluène</p> <p><math>\mu_a(T) \cdot S \cdot Bc</math> : croissance de la biomasse</p> <p><math>(-D - \beta_c \cdot T) \cdot Bc</math> : élimination de la biomasse complexe autre qu'Alteromonas par dilution et par lyse</p> $dS/dt = D(S_{in} - S) - \alpha_a \cdot \mu_a(T) \cdot S \cdot Ba - \alpha_c \cdot \mu_c(T) \cdot S \cdot Bc + \beta_a \cdot T \cdot Ba + \beta_c \cdot T \cdot Bc$ <p><i>dS/dt : Variation du substrat</i></p> <p><math>-\alpha_a \cdot \mu_a(T) \cdot S \cdot Ba</math> : Substrat assimilé par Alteromonas (en tenant compte du rendement bactérien)</p> <p><math>-\alpha_c \cdot \mu_c(T) \cdot S \cdot Bc</math> : Substrat assimilé par la biomasse complexe autre qu'Alteromonas (en tenant compte du rendement bactérien)</p> <p><math>\beta_a \cdot T \cdot Ba</math> : retour du substrat limitant dans le milieu suite à la lyse d'Alteromonas</p> <p><math>\beta_c \cdot T \cdot Bc</math> : retour du substrat limitant dans le milieu suite à la lyse de la biomasse complexe autre qu'Alteromonas</p>
<p><b>Modèle secondaire : incorporation de leucine dans un tube séparé</b></p> $dBa^*/dt = \mu_a(T) \cdot S \cdot Ba - \beta_a \cdot T \cdot Ba^*$ $dBa/dt = -\beta_a \cdot T \cdot Ba$ $dBc^*/dt = \mu_c(T) \cdot S \cdot Bc - \beta_c \cdot T \cdot Bc^*$ $dBc/dt = -\beta_c \cdot T \cdot Bc$ $dS/dt = -\alpha_a \mu_a(T) \cdot S \cdot (Ba + Bc) + \beta_a \cdot T \cdot B ;$
<p>avec</p> <p><i>Bt biomasse totale en <math>\mu g L^{-1}</math></i></p> <p><i>Bc biomasse complexe autre qu'Alteromonas en <math>\mu g L^{-1}</math></i></p> <p><i>Ba, biomasse d'Alteromonas en <math>\mu g L^{-1}</math></i></p> <p><i>Ba*, Bc* : biomasse radioactive d'Alteromonas et de biomasse complexe autre qu'Alteromonas</i></p> <p><i><math>\beta_a, \beta_c</math>, coefficient de lyse d'Alteromonas et de la biomasse complexe en <math>\mu g L^{-1}</math></i></p> <p><i>S, S<sub>in</sub>, concentration du substrat limitant dans le chemostat et dans l'alimentation en <math>\mu g L^{-1}</math></i></p> <p><i>D, taux de dilution en jours<sup>-1</sup></i></p> <p><i>T, concentration du toluène en <math>\mu M</math></i></p> <p><i>1/<math>\alpha_a</math>, 1/<math>\alpha_c</math>, rendement bactérien d'Alteromonas et de la biomasse complexe</i></p> <p><i><math>\mu_a(T), \mu_c(T)</math>, taux de croissance d'Alteromonas et de la biomasse complexe en fonction de la concentration T de toluène</i></p>

Ces deux modèles couplés permettent de faire le lien entre une biomasse produite dans un tube séparé (estimée par l'incorporation de leucine) et la biomasse dans le chemostat estimée par la densité bactérienne et le contenu cellulaire de carbone. Ce dernier varie au cours de l'incubation car le volume cellulaire varie au cours de l'incubation en favorisant les cellules de grande taille.

### **III.2.4. Schéma expérimental testant la résilience du bactérioplancton marin**

Nous avons vu que la structure des communautés de bactérioplancton hétérotrophes du littoral et du large présentaient des gradients. Ces gradients sont contrôlés par les événements environnementaux. En prélevant deux communautés bactériennes de structure différente, nous pouvons tester si les événements environnementaux ont engendré des communautés de résilience différente.

Nous avons utilisé deux paires de chemostats continus inoculés avec ces communautés bactériennes (Figure III.2-10). Nous avons appliqué un choc de toluène au 13<sup>ième</sup> jour. Nous avons suivi la réponse de la production bactérienne (réponse « fonctionnelle ») et de la structure de la communauté par SSCP.



**Figure III.2-10 : Schéma expérimental testant la résilience du bactérioplancton littoral et du large**

**III.3. Article: *Alteromonas* sp. is a key species for resilience of carbon mineralization in two different seawater bacterial communities with contrasting history**

Zemb, O., West, N., Bourrain, M., Godon, J.J., Lebaron, P.

In preparation for Aquatic Microbial Ecology

**Abstract**

To understand the importance of the bacterial composition on the functional resilience of carbon assimilation, chemostats were inoculated with shore or offshore communities. The production of biomass in the first case resulted from a complex bacterial consortium while it was mainly due to an *Alteromonas* strain in offshore communities. Resilience was measured by perturbing communities with toluene at saturation, which is a density-independent mortality event. The production was totally inhibited when the toluene was present and peaked temporarily to 5-10 folds a few days after the toluene was removed by physical ways. Active, large *Alteromonas* cells were favoured in both communities, showing that *Alteromonas* was a key species for resilience. We show that the bacterial production after a shock can be captured by a simple model for near the shore communities. The resilience of the offshore communities that are dominated by *Alteromonas* could not be captured by this simple model. These experiments suggest that ecosystems used to perturbations are composed of micro organisms whose life strategies are more adapted to assimilate released substrate.

## **Introduction**

The oceans play a major role in the global carbon cycle by the important exchange of carbon dioxide between the ocean and the atmosphere. In the oceans, marine heterotrophic bacteria participate in the carbon cycle in two major ways, by the production of biomass from dissolved organic carbon (DOC) and by the release of carbon dioxide by respiration (Azam, 1998). At least 50% of the organic carbon from primary production is remineralized by heterotrophic bacteria (Anderson and Ducklow, 2001). Given the importance of heterotrophic bacteria in the functioning of the carbon cycle, it is crucial to study the mechanisms of their functional resilience (i.e. return time) in response to a perturbation.

The effect of environmental change on aquatic microbes is usually studied *in vitro* since it is easier to control the experimental conditions. Microcosms such as bottle incubations are frequently used to explore the changes in the microbial community structure and function after nutrient additions (Ovreas et al., 2003) or changes in mortality due to grazing (Flaten et al., 2003) or viral lysis (Proctor and Fuhrman, 1992, Winter et al., 2004, Hewson and Fuhrman, 2006). Larger volume enclosures, mesocosms, are also popular for such studies (e.g. (Vadstein et al., 2003)) and are advantageous in that they reduce the effects of confinement, the so-called "bottle effect" (Schafer et al., 2000). The reasons for the bottle effect are could be due at least partly to nutrient depletion (Hagstroem et al., 1984) or to absence of predators (Ferguson et al., 1984). An alternative to using these closed enclosures is continuous culture in chemostats (Massana and Jurgens, 2003). Continuous culture is the method of choice for characterizing the physiology of different microbial species under a wide range of growth and environmental conditions (see (Hoskisson and Hobbs, 2005) for a review). In their seminal paper, Hagström et al. (1984) demonstrated that growth of marine bacteria could be sustained with particle-free unsupplemented seawater. The great advantage of using chemostats over closed systems (batch cultures), is that the microbial population grows at a constant rate under constant physico-chemical conditions and achieves a steady state, allowing the effects of changes in environmental factors to be clearly observed. The major drawback of small chemostat is that slow growing cells may be washed out if the dilution rate is too high and that low dilution rates do not generate enough material for further studies. Here we circumvent this problem by using large chemostats to monitor the structure of the bacterial community simultaneously with functional resilience.

In order to follow the response of microbial communities over time to changes in environmental factors, rapid methods are needed to give an overview of the microbial community structure. Fingerprinting methods such as DGGE, SSCP, T-RFLP and ARISA for analysis of 16S rRNA genes have been used widely to study bacterial diversity in terrestrial (Ranjard et al., 2006b) and aquatic environments (Ghiglione et al., 2005, Fuhrman et al., 2006). SSCP using capillary electrophoresis CE-SSCP is particularly suited to spatial and temporal studies because of the high-throughput. CE-SSCP was used to compare the microbial diversity of many samples collected from horizontal and vertical profiles and from time series and these comparisons allowed a sampling strategy to be defined (Ghiglione et al., 2005). Although there are potential biases from using PCR-amplification of 16S rRNA genes prior to analysis by fingerprint techniques (Kanagawa, 2003b), these techniques are

acknowledged to be reproducible (Ghiglione et al., 2005) and the relative abundance of individual peaks/bands and species abundance may be extracted from data (Loisel et al., 2006).

The functional resilience of soil bacterial communities in response to perturbations has been well studied (e.g. (Girvan et al., 2005 , Saison et al., 2005). It can be measured on several levels. For example, Girvan et al. (2005) defined the degradation of 2,4-dichlorophenol as narrow niche function and mineralization of wheat shoot as broad scale function. However, few studies have been carried out to determine the resilience of marine bacterial communities. The effect of heavy metals and polychlorinated biphenols (PCB's) on marine bacteria from oligotrophic coastal waters was investigated in microcosms and demonstrated that the heterotrophic bacteria showed resilience in terms of biomass but not bacterial production (Caroppo et al., 2006).

Furthermore, different communities exhibit different functional resiliencies. For example, more diverse bacterial communities exhibited greater resilience of narrow niche function (Girvan et al., 2005). Some differences were also stated on the broad scale function of anaerobic digesters submitted to a glucose pulse, depending on the flexibility and the potentiality of parallel processing in the community (Fernandez et al., 2000a , Hashsham et al., 2000).

However, the role of species composition (Hashsham et al., 2000, Griffiths et al., 2004) and species' tolerance for a major disturbance (Atlas and Bartha, 1993) remain unclear. In this context, the 'everything is everywhere' dogma is in opposition the idea that resilience depends of endemic species. To adress this question, the marine bacterial communities are very convenient models as recent molecular studies suggest that environmental conditions influence the presence of at least some bacterial species (Cunha et al., 2001, Fuhrman et al., 2006). Indeed large- and fine- scale gradients are observed in the sea. For example, some bacteria are cosmopolitan while others are endemic (Pommier et al., 2005) and the structure of shore and offshore bacterial communities are different (Schauer et al., 2000, Ghiglione et al., 2005). Moreover, life strategies traits of coastal species might differ from those of offshore species (Weinbauer et al., 2006).

The aim of this study was to investigate the response of coastal and offshore marine bacterial communities to a chemical perturbation and to determine if the same key species were responsible for the functional resilience of the different communities. The growth properties of the key species were compared to determine if their physiological responses were shaped from the ecosystem history. To achieve this, replicate chemostats were inoculated with coastal and offshore marine bacterial communities. The changes in bacterial community structure after a brief toluene shock were monitored by CE-SSCP, and the functional resilience of carbon assimilation into biomass was followed by leucine incorporation and flow cytometry. The experimental data were interpreted with the help of a simple model.

## **Materials and methods**

### *Sampling of seawater*

Seawater of the North West Mediterranean Sea was collected on 06/04/2006 at the station located one mile from the shore (SOLA station, 5-m depth) and located at 18 miles from the shore (MOLA station, 42°27'04" 03°31'93", 80-m depth). For the seawater coming from SOLA, the national service

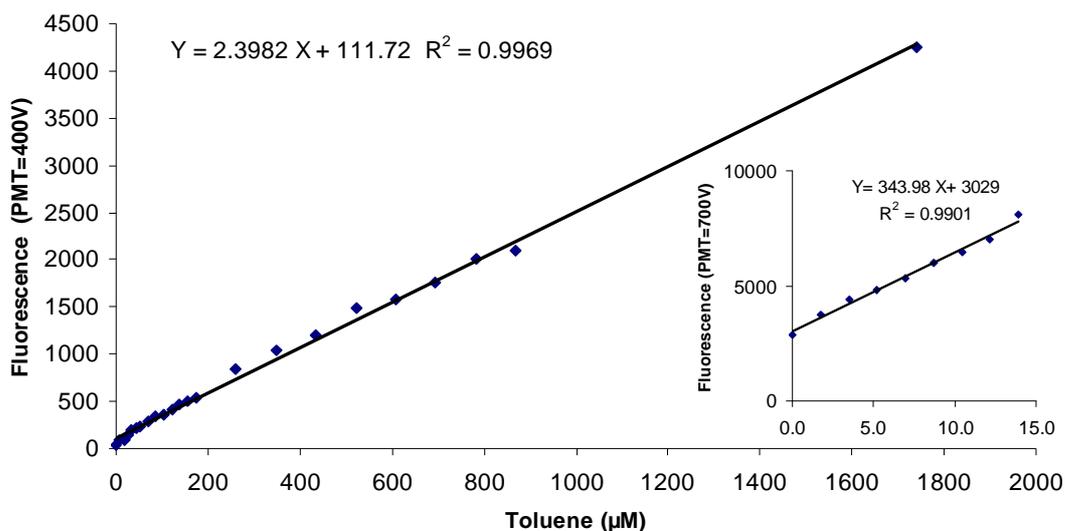
SOMLIT monitored nitrogen concentration of  $0.53 \mu\text{mol L}^{-1}$  for  $\text{NH}_4$ ,  $1.82 \mu\text{mol L}^{-1}$  for  $\text{NO}_3$  and  $0.26$  for  $\text{NO}_2$ . For the seawater coming from MOLA, nitrogen concentrations were  $0.26 \mu\text{mol L}^{-1}$  for  $\text{NH}_4$ ,  $9.23 \mu\text{mol L}^{-1}$  for  $\text{NO}_3$  and  $0.13 \mu\text{mol L}^{-1}$  for  $\text{NO}_2$ . Chlorophyll content was  $0.87 \mu\text{g L}^{-1}$  for SOLA and  $0.55 \text{g L}^{-1}$  for MOLA. Seawater was serially filtered on  $3\mu\text{m}$  pore-size GF/D and  $0.8\mu\text{m}$  pore-size GF/F filters (Whatman, Dassel, Germany) to eliminate grazers and phytoplankton.

*Chemostat design, bacterial inocula and controls*

All-glass chemostats of 7 L were inoculated with 6L of filtered seawater. The two chemostats inoculated with the bacterial communities sampled at SOLA are referred to “shore communities” and the two chemostats inoculated with the MOLA bacterial communities are referred to “offshore communities”. Nutrients were provided continuously from the same bottle of autoclaved seawater with a peristaltic Ecoline pump (Bioblock, Montpellier, France) at the rate of 10 ml per hour (i.e. hydraulic retention time of 25 days, dilution rate of 0.04). Seawater for supply was collected at the SOLA station (5m depth) and autoclaved for 2h at  $110^\circ\text{C}$ . A filter ed ( $0.2\mu\text{m}$  pore-size GV filters, Durapore, Millipore Corp.) air system saturated the chemostats with sterile oxygen. The entire apparatus was maintained in the dark in a constant temperature chamber at  $16^\circ\text{C}$ .

*Application and monitoring of the toluene shock*

In order to characterize the reaction to a shock of the bacterial communities, a temporary pulse of toluene (ACS-iso for analysis, Carlo Erba) at saturating concentrations (10 ml per chemostat) was applied for 24 h on day 13. To monitor toluene concentration, 5-ml samples were collected twice daily between the day 13 and the day 17. Most of the toluene was eliminated from the chemostat after this period by stopping the stirring and removing the upper toluene phase by pumping. The remaining toluene was evacuated by the air system within 12 hours due to the high volatility of toluene. The toluene concentration was monitored by spectrofluorometry (Shimadzu F-2500, Shimadzu Corp.) as the toluene emits naturally fluorescence when excited at 261 nm. 5mL-samples were collected through a side septum. The same day, 2 ml aliquots of the sample were excited at 261 nm and fluorescence was collected at 285 nm. The sensitivity of the assay was modified by selection of 400 or 700 volts for the photomultiplier depending on the intensity of the collected signal, which allowed quantification from 5 to  $2000 \mu\text{M}$ . For each scale, a calibration curve was performed on a dilution series of toluene (Figure III.3-1).



**Figure III.3-1 : High-range (PMT=400V) and low-range (insert, PMT=700V) calibration plots for estimation of toluene concentration through spectrofluorometry.**

*Seawater samples were excited at 261 nm and fluorescence was measured at 285 nm.*

#### *Measure of the bacterial production by leucine incorporation*

Bacterial production was measured with incubations of 5 ml with radioactive leucine on days 1, 2, 5, 7, 8 and 9. On day 13, bacterial production was measured before, 4 hours and 10 hours after the toluene addition. After the shock of day 13, it was measured twice daily until the day 17. It was then measured on days 19, 20, 21, 22, 23, 25, 27, 28, 29, 32 and 33. Bacterial production was estimated from the rates of protein synthesis using [ $^3\text{H}$ ]-L-leucine (Amersham, S.A.,  $117 \text{ Ci mmol}^{-1}$ ) as described before (Simon and Azam, 1989, Lebaron et al., 2001a) with slight modifications. Duplicate samples (5 ml) and one trichloroacetic acid (TCA)-killed control (5 mL) were incubated with [ $^3\text{H}$ ]-L-leucine (4 nmol  $\text{L}^{-1}$  final concentration) and 16 nmol  $\text{L}^{-1}$  of leucine. Samples were incubated in the dark in the same chamber as the chemostats for 1 to 3 h depending on the bacterial production expected from previous experiment. Incubations were terminated by adding TCA (5% final concentration). Subsequently, the samples were incubated at 4°C for at least four hours and then centrifuged at 13000 rpm for 15 minutes. The pellets were gently washed once with 1 ml TCA (5%) and once with ethanol (70% v/v) without disturbing the pellet (centrifuging at 13000 rpm, 5 min) before resuspending the pellets in liquid scintillation cocktail (FilterCount, Packard) for radioassaying with a scintillation counter LS 5000CE (Beckman). The number of disintegrations per minute was converted into picomoles (pmol) of incorporated leucine.

#### *Quantification of cell numbers and cell size by flow cytometry*

Samples of 100 µl were collected on a daily basis from each chemostat, fixed with formaldehyde (2% v/v final concentration) and the cells stained with 2.5µl of a 1/10000 dilution of SybrGreen1 (Molecular Probes) for 20 min at room temperature in the dark. Counts were performed with a FACSCalibur flow

cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) equipped with an argon laser (488 nm, 15 mW). Stained bacterial cells, excited at 488 nm, were enumerated according to their side scatter (SSC) and green fluorescence (FL1) collected at 450/50 nm. CellQuest software (Becton Dickinson) was then used to provide mean values of bacterial density and scatter. Fluorescent beads (0.94  $\mu\text{m}$ ) (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) were added to each sample to normalize cell fluorescence emission and scatter (rSSC) values among samples.

#### *Monitoring of changes in bacterial community structure by SSCP analysis*

Volumes of 100-200 ml for SSCP analysis were collected from each chemostat on days 0, 2, 4, 5, 7, 9, 13, 15, 17, 18, 22, 25, 29, 31 and 33 by stopping the output pump for a few hours and then setting a high flow rate to pump the accumulated water. The samples were filtered into 0.2  $\mu\text{m}$  pore-size Sterivex filter units (Millipore) and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  before DNA extraction. Cell lysis was accomplished according to the protocol of Ghiglione et al. (2005) with slight modifications : An initial incubation for 45 min at  $37^{\circ}\text{C}$  was performed after adding 50  $\mu\text{l}$  of freshly prepared lysosyme solution (20  $\text{mg ml}^{-1}$ ) and 1.6 ml of alkaline lysis buffer (50 mM Tris hydrochloride pH 8.3, 40 mM EDTA, 0.75 M sucrose). A second incubation at  $50^{\circ}\text{C}$  was performed for 1 h after adding 100  $\mu\text{l}$  of 10% sodium dodecyl sulfate and 10  $\mu\text{l}$  of proteinase K (20  $\text{mg ml}^{-1}$ ). The lysate was then purified using the DNeasy tissue Kit (Qiagen) (Elution in 100  $\mu\text{l}$  EB).

For SSCP analysis, a short fragment (205bp) of the V3 region of the 16 rDNA gene was PCR amplified using the universal bacterial primers W49 (ACGGTCCAGACTCCTACGGG); *E. Coli* positions (329-348) and 6-FAM labelled W104 5'(TTACCGCGGCTGCTGGCAC)3'; *E. Coli* positions (515-533) (Eurogentec, Belgium), and Pfu Turbo DNA polymerase (Stratagene , the Netherlands) as described by Chachkhiani et al (2004). PCR reactions contained 0.4  $\mu\text{M}$  primers, 0.2 mM dNTPs and 2.5 U *Pfu*. Cycling conditions were 2 min at  $94^{\circ}\text{C}$  followed by 25 cycles of a three-stage program with 30 s at  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 s at  $61^{\circ}\text{C}$ , 30 s at  $72^{\circ}\text{C}$ , and a final elongation for 10 min at  $72^{\circ}\text{C}$ . Amplification product sizes were confirmed by agarose gel electrophoresis. PCR products were then diluted 10 to 600-fold, and 1  $\mu\text{l}$  of the dilution was denatured in 19  $\mu\text{L}$  formamide together with the internal standard ROX 400HD (ABI) during 10 minutes at  $94^{\circ}\text{C}$  and rapidly cooled in an ice bath. The sample was then analysed under non-denaturing conditions by SSCP capillary electrophoresis with an ABI 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems) using the protocol described by Delbes et al (2000). Data analysis was done with SAFUM, an adapted software developed with Matlab™ especially for SSCP analysis. In brief, the spectra were imported into workable vector in Matlab™ which was used to perform all further calculations including area normalization, principal component analysis and peak detection.

#### *Assignment of the major SSCP peak by cloning and sequencing of 16S rRNA genes*

Almost full length 16S rRNA genes were PCR amplified from DNA samples extracted from a shore and an offshore chemostat after 18 days using the universal bacterial primers 27F<sub>mod</sub> (5'-AGRGTGGATCMTGGCTCAG) and 1492<sub>mod</sub> (5'-TACGGYTACCTTGTTAYGACTT) (Vergin et al., 1998). For each DNA sample, 5 replicate PCR reactions were made to reduce PCR bias. Each 50  $\mu\text{l}$  PCR reaction contained 1  $\mu\text{l}$  template DNA together with 0.1  $\mu\text{M}$  primers, 0.8 mM dNTPs, 2U of SuperTaq Polymerase and 1X SuperTaq buffer (HT Biotechnology, Cambridge, UK). The reactions

were cycled using the following parameters: an initial denaturation of 3 min at 94 °C followed by 25 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 50 °C and 2 min at 72 °C with a final extension of 10 min at 72 °C. To reduce the presence of heteroduplexes, the replicate PCR reactions were pooled and purified with the Qiaquick PCR purification kit (dilution in 50µl EB buffer) before undergoing reconditioning PCR (Thompson et al., 2002). Briefly, 10 µl of purified products were added to 90 µl of fresh PCR mix before cycling a further 5 times with the above PCR parameters. The presence of a single band of the correct size was verified by agarose gel electrophoresis. PCR products were cloned the same day using the TOPO TA cloning kit (pCR2.1 vector; Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Ten white clones were picked from each of the 2 clone libraries for Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) screening before sequencing. Inserts from the clones were PCR amplified directly from *E.coli* cells by using the M13F and M13R primers. Each 25 µl PCR reaction contained 1 µM primers, 0.8 mM dNTPs, 1U of SuperTaq Polymerase and 1X SuperTaq buffer. *E.coli* cells were inoculated into the PCR reactions with a toothpick and the reactions were cycled using an initial denaturation of 7 min followed by 25 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 55 °C and 2 min at 72 °C with a final extension of 5 min at 72 °C. PCR products (5µl) were digested with 5 U of the restriction enzymes *HhaI* or *RsaI* (Promega) with 1X enzyme buffer and 10 mM BSA at 37 °C overnight and the fragments separated by electrophoresis in 2% agarose gels. RFLP patterns were compared manually and the clones assigned to different RFLP groups based on the restriction patterns of both enzymes. One representative of each RFLP group for each sample was selected for full length sequencing using the primers E785F (5'GGATTAGATACCCTGGTAGT) and 907R (5'CCGTCAATTCCTTTGAGTTT). Sequences were corrected manually and assembled using the sequence editing software Bioedit. The sequences were then submitted to BlastN (Altschul et al., 1997) to find the closest relative.

#### *Model Description*

The model used to interpret the data attempts to describe carbon flow via differential equations. This allows link the biomass production measured punctually with the daily biomass output through dilution. Each simulation of time dependant population consists of three distinct steps:

1) Simulation of the biomass and the available substrate using the primary model, 2) conversion of this simulated biomass into cell density using estimates of cellular carbon content, and 3) conversion of the simulated biomass and substrate into incorporated leucine using a secondary model.

Initially, the primary model was used to simulate dilution, uptake, respiration and release of organic matter from the toluene-lysed cells and assimilation of this matter by an opportunistic bacterial strain identified as *Alteromonas* in the chemostat. Therefore, the three state variables in the primary model were: dissolved organic (DOC) carbon, complex bacterial biomass and *Alteromonas* biomass. Complex bacterial biomass was neglected for offshore communities because the community was dominated by a single peak assigned as *Alteromonas*. The state variables are expressed in the same units of mass (µg of carbon L<sup>-1</sup>) and all equations describe rates of carbon flow in units of mass per unit time (Table I-1). Parameter values used are published theoretical estimates (Table III-2).

Secondly, the modelled biomass was converted in observable bacterial density using the cellular carbon content and the relative side scatter (rSSC) value observed by cytometry. This conversion was

done using the relationships for C (carbon content per cell in fg C cell<sup>-1</sup>) and V (biovolume in μm<sup>3</sup>), determined by Troussellier et al. (1999) and Azam et al. (1983): (1) V = 8.06 rSSC - 0.02 and (2) C = 92 V<sup>0.598</sup>. For rSSC higher than 0.07, carbon content per cell was assumed to be equal to 68 μg.

Thirdly, the measured incorporation of leucine was compared to the expected incorporation given the simulated biomass and substrate using a secondary model.

This secondary model was designed so that the lytic effect of the toluene was not neglected during the incubation time with the labelled leucine. The parameters for the bacterial growth are those for the primary model. The constant needed to convert biomass into leucine consumption was taken from the literature (Buesing and Marxsen, 2005b). Equations of this secondary model are summarized in Table III-1.

The equations (Table I-1) were implemented in Matlab<sup>TM</sup> and resolved using the ODE45 algorithm.

**Table III-1 :Model equations**

<p><b>Primary model (for the chemostat)</b></p> $dB_t/dt = (\mu_a(T) \cdot S - D - \beta_a \cdot T) \cdot Ba + (\mu_c(T) \cdot S - D - \beta_c \cdot T) \cdot Bc$ $dS/dt = D(S_{in} - S) - \alpha_a \cdot \mu_a(T) \cdot S \cdot Ba - \alpha_c \cdot \mu_c(T) \cdot S \cdot Bc + \beta_a \cdot T \cdot Ba + \beta_c \cdot T \cdot Bc$
<p><b>Secondary model (for the leucine incorporation)</b></p> $dBa^*/dt = \mu_a(T) \cdot S \cdot Ba - \beta_a \cdot T \cdot Ba^*$ $dBa/dt = -\beta_a \cdot T \cdot Ba$ $dBc^*/dt = \mu_c(T) \cdot S \cdot Bc - \beta_c \cdot T \cdot Bc^*$ $dBc/dt = -\beta_c \cdot T \cdot Bc$ $dS/dt = -\alpha_a \mu_a(T) \cdot S \cdot (Ba + Bc) + \beta_a \cdot T \cdot B ;$
<p>B<sub>t</sub> total biomass in μg L<sup>-1</sup>                      B<sub>c</sub> complex biomass concentration in μg L<sup>-1</sup>                      B<sub>a</sub>, biomass concentration of <i>Alteromonas</i> in μg L<sup>-1</sup>                      B<sub>a</sub><sup>*</sup>, B<sub>c</sub><sup>*</sup>, the radioactive biomass in <i>Alteromonas</i> and in complex biomass in μg L<sup>-1</sup>                      β<sub>a</sub>, β<sub>c</sub>, the hypothetical sensitivity to toluene of <i>Alteromonas</i> and of complex biomass in μg L<sup>-1</sup>                      S, S<sub>in</sub>, the substrate concentration in the chemostat and in the supply tank in μg L<sup>-1</sup>                      D, the dilution rate in d<sup>-1</sup>                      T, the concentration of toluene in μM                      1/α<sub>a</sub>, 1/α<sub>c</sub>, the yield coefficient of <i>Alteromonas</i> and of the complex biomass                      μ<sub>a</sub>(T), μ<sub>c</sub>(T), the growth rates of <i>Alteromonas</i> and of the complex biomass given the amount T of toluene</p>

Table III-2 : Parameters used in the model

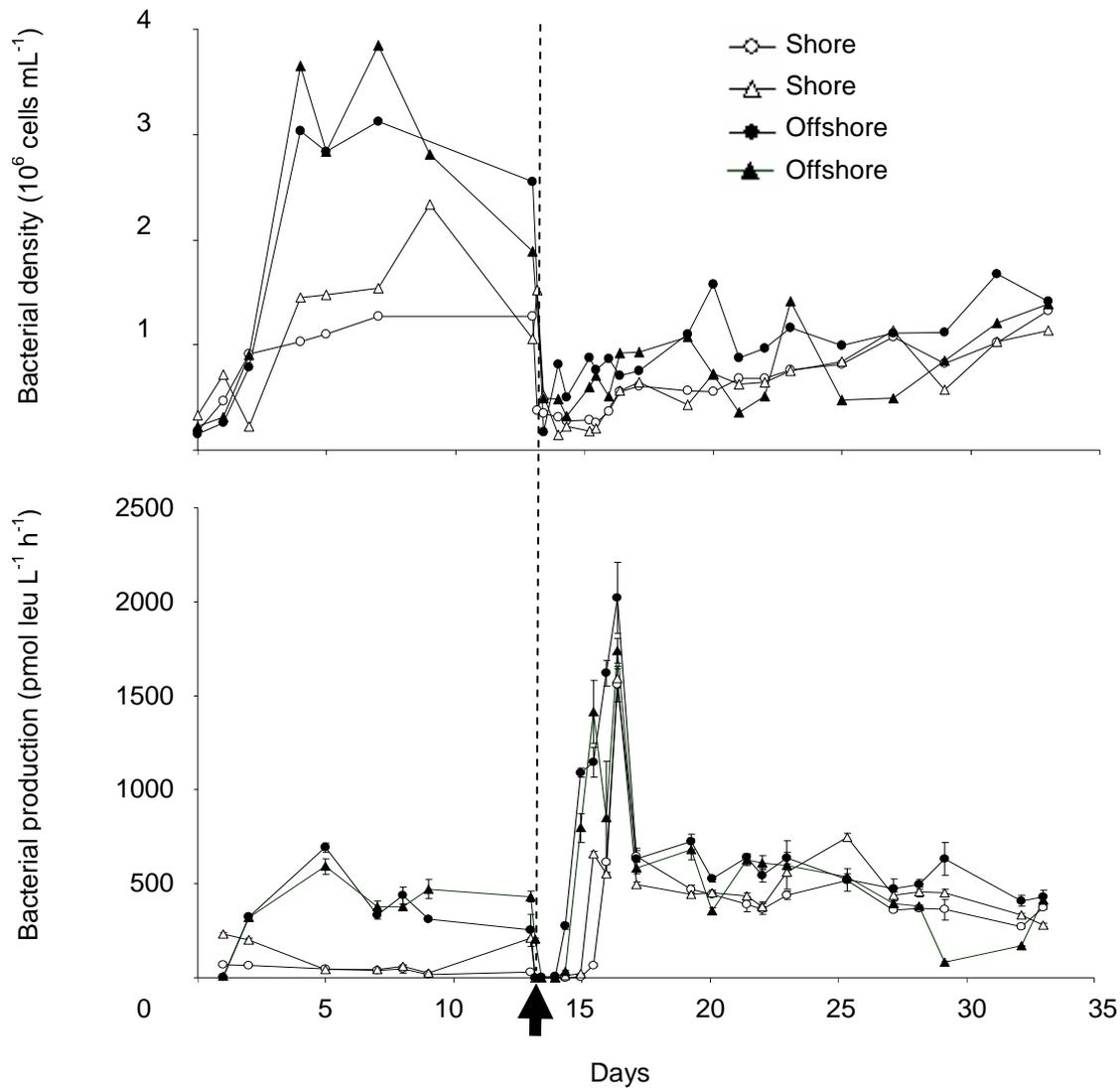
	Complex Consortium sampled at SOLA	<i>Alteromonas</i> sp. sampled at SOLA	<i>Alteromonas</i> sp. sampled at MOLA	Units
Dilution rate (D)	0.04	0.04	0.04	d <sup>-1</sup>
Substrate input concentration (S <sub>in</sub> )	300	300	300	µg L <sup>-1</sup>
Initial substrate (S <sub>0</sub> )	5	5	0	µg L <sup>-1</sup>
Initial Biomass (B <sub>0</sub> )	13	37	50	µg L <sup>-1</sup>
Toluene Threshold (b) that inhibits growth	5	5	5	µM
Growth rate (µ) for [Toluene]<b	0.02	0.02	0.02	d <sup>-1</sup> µg <sup>-1</sup> L
Yield coefficient (1/α)	25%	50%	50%	No unit
Sensitivity to toluene (β)	7 10 <sup>-4</sup>	2.8 10 <sup>-4</sup>	2.8 10 <sup>-4</sup>	d <sup>-1</sup>
Carbon -Leucine conversion factor	1.44 10 <sup>-9</sup>	1.44 10 <sup>-9</sup>	1.44 10 <sup>-9</sup>	g pmol <sup>-1</sup>
Cellular carbon content	40	60	60	fg

## Results

The effect of a toluene shock on the bacterial community structure and function in coastal and offshore seawater was followed in replicate chemostats by flow cytometry, SSCP analysis and bacterial production measurements.

### *Steady-state and reaction to the shock of shore communities*

For the shore communities, the bacterial density increased slightly during the 13 first days. The continuous input of substrate sustained an average cellular density in both shore communities of  $1.39 \pm 0.4 \cdot 10^6$  cells ml<sup>-1</sup> (Figure III.3-2A) and a bacterial production of  $57 \pm 37$  pmol leu L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> between the day 1 and the day 13 (Figure III.3-2B) despite the daily output of 240 ml. Mean cell size was evaluated at  $0.45 \mu\text{m}^3$  (i.e. cellular carbon content of 40 fg).

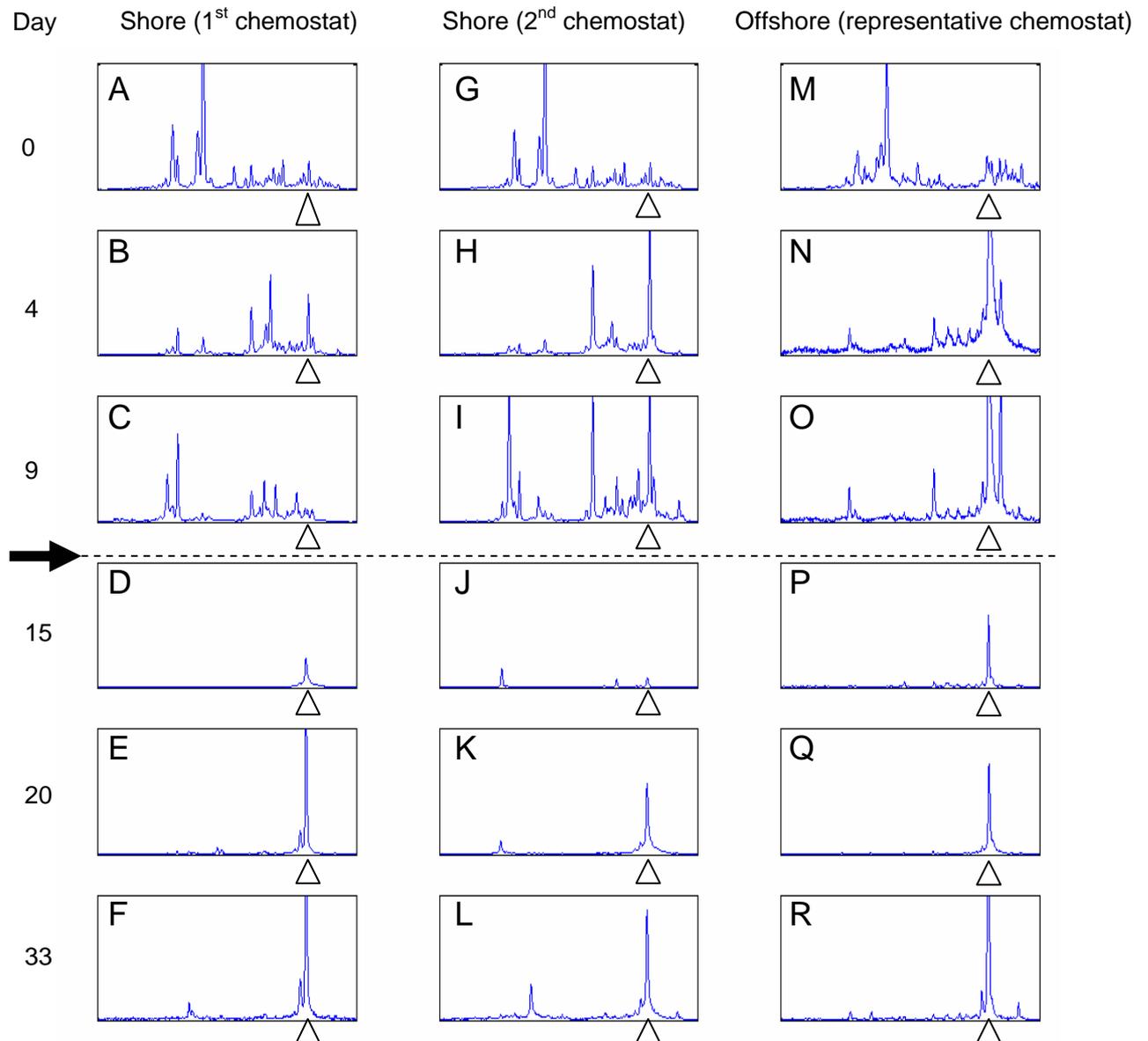


**Figure III.3-2 : Experimental bacterial density (A) and production (B) in the chemostats inoculated with shore and offshore bacterial communities**

*Shore communities (open symbols, triangles for the first chemostat and circles for the second one) or offshore bacterial communities (filled symbols, triangles for the first chemostat and circles for the second one). The toluene addition is represented by an arrow.*

Figure III.3-3 shows the evolution of the bacterial community with time before and after the toluene shock. After 4 days, the profiles from the replicate chemostats showed common peaks but the relative abundances of the major peaks were different from each other. Furthermore, in both replicate chemostats after 4 days there was a shift in the abundance if the major peaks from the left to the right of the profile. This change probably corresponded to a reduction in the abundance of the alphaproteobacteria and cyanobacteria (left peaks) and to an increase in the relative abundances of the gammaproteobacteria and/or CFB (right peaks) (Raphael Lami, unpublished data). After the toluene shock, only a single peak was detected and remained dominant until the end of the experiment. After the addition of toluene, no leucine incorporation was detectable and the bacterial

density decreased to  $2.29 \pm 1.18 \cdot 10^5$  cells ml<sup>-1</sup>. This reduction in cell density was accompanied by a reduction in the profile diversity from 25 peaks to 1 or 3 depending on the chemostat (Figure III.3-3). Two days after the shock, one population of larger cells (cellular carbon content estimated at 60 fg) emerged concomitantly (data not shown) with one dominant phylotype and the bacterial production increased dramatically to  $1576 \pm 22$  pmol leu L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> three days after the shock. Seven days after the shock, the bacterial production stabilized at  $430 \pm 98$  pmol leu L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> (Figure III.3-2B). The main feature of shore communities was a pronounced rebound of the productivity after the shock that coincides with a phylotype is obviously favoured after the shock.



**Figure III.3-3 : Fingerprint in the two shore communities (A-F and G-L) and one offshore community (M-R)**

*Fingerprint in the two shore communities (A-F and G-L) and one offshore community (M-R) during the experiment. The sampling days were 0 (A,G,M), 7 days after inoculation (B,H,N), 9 days after inoculation (C,I,O), 2 days after the shock (D,J,P), 9 days after the shock (E,K,Q) and 20 days after*

the shock (F,L,R). The areas were normalized by the bacterial density. The peak assigned as *Alteromonas* sp. is indicated with an arrow head. The toluene addition is represented by an arrow.

#### *Steady-state and reaction to the shock of offshore communities*

For the offshore communities, the cellular density first increased dramatically during the first four days of incubation from  $1.88 \pm 0.4 \cdot 10^5$  to  $2.94 \pm 0.5 \cdot 10^6$  cells ml<sup>-1</sup> that was sustained between the day 4 and 13 (Figure III.3-2A), which was twice as much as the density sustained in the shore communities. The bacterial production was  $410 \pm 118$  pmol leu L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, which was 8 times higher than the production observed for shore communities (Figure III.3-2B). The change in bacterial community structure is shown in Figure III.3-3. As the SSCP profiles between the replicate chemostats were identical at each time point, a single replicate is shown. In contrast to the shore communities that remained complex, the SSCP profiles became dominated by a single peak after 2 days. This peak emerged concomitantly to a single large cell population observed by flow cytometry (data not shown). After the addition of toluene, no leucine incorporation was detectable and the bacterial density decreased by nearly a factor of ten to  $3.28 \pm 2.27 \cdot 10^5$  cells ml<sup>-1</sup>, which is similar to the decrease observed in shore communities.

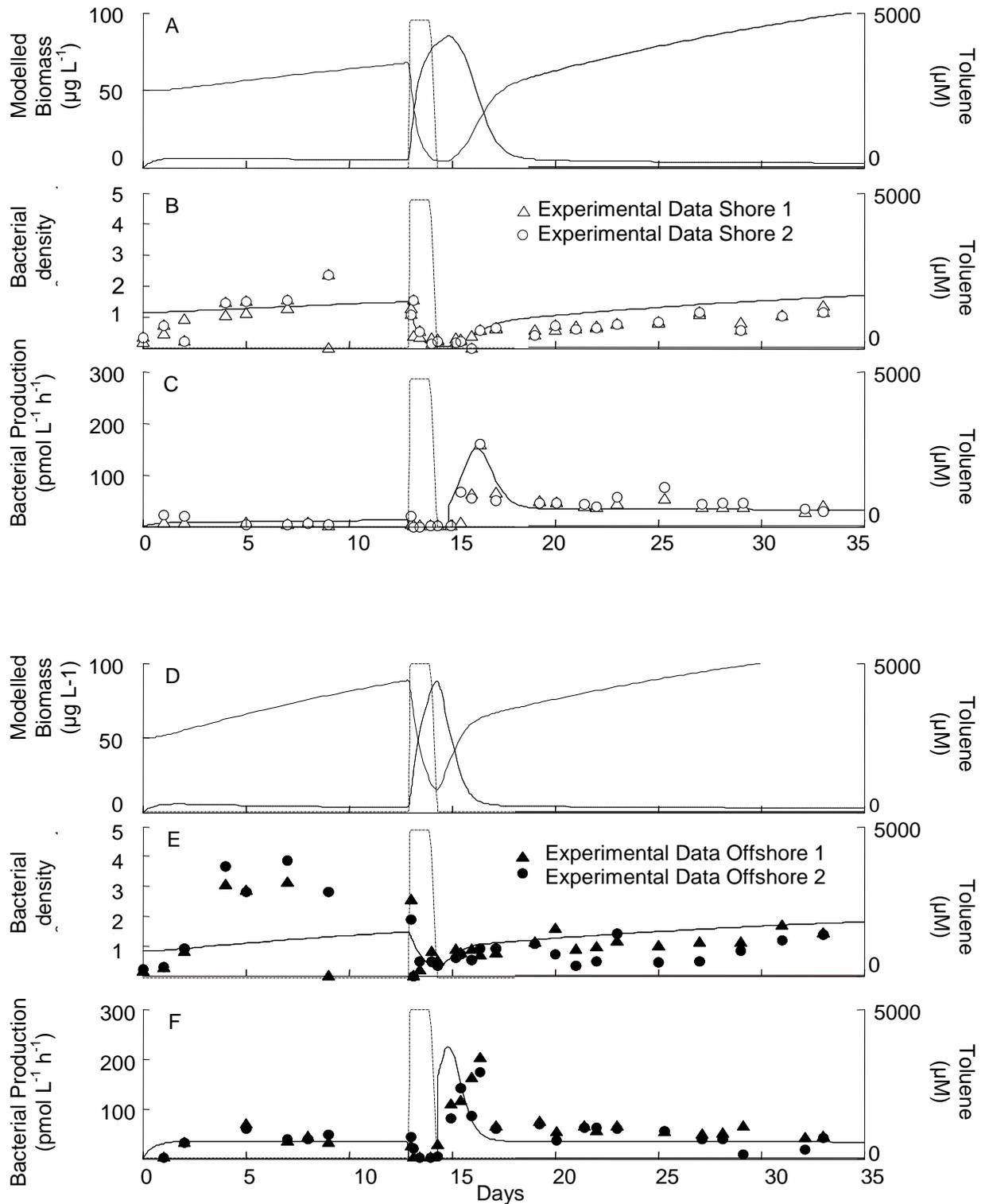
After the elimination of toluene, the functional recovery of the offshore bacteria was faster than for the shore bacteria. Two days after the shock, the bacterial abundance was  $7.41 \pm 1.97 \cdot 10^5$  cells ml<sup>-1</sup>, three times higher than for the shore communities at the same time. The bacterial production started again one day after the shock and for a short period of time attained up to five times the initial production rate three days after the shock ( $1881 \pm 200$  pmol leu L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>). The maximal production of offshore communities was higher than for shore communities, but it was not statistically meaningful due the low number of samples. Seven days after the shock, the production was stabilized at  $485 \pm 128$  pmol leu L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> which was identical to the steady state after the shock of the shore communities (Figure III.3-2).

#### *Assignment of the major SSCP peak*

The major SSCP peak observed after the toluene shock for the shore chemostats, and before and after the shock for the offshore chemostats, was assigned by cloning and sequencing of 16S rRNA genes. The majority of the clones (9 out of 10 for each sample) showed 99% identity to *Alteromonas* sp. SPB-8 (accession no. DQ412077) demonstrating that the same *Alteromonas* species was favoured, and dominated in both the shore and offshore chemostats. This suggests that both communities recovered due to the biomass synthesis of *Alteromonas*.

#### *Results of the model*

To better understand the role of biomass synthesis, two complementary models were created, one that simulated biomass dynamics in the chemostat and one that simulated the labelled biomass dynamics in the incubation performed to measure bacterial production. We saw that the bacterial production in offshore communities recovered faster than those of shore communities (Figure III.3-2), but the model suggested that this did not occur as fast as expected, given the high abundance of *Alteromonas* before the shock in the offshore communities (Figure III.3-4F).



**Figure III.3-4 Modelled Biomass, density and production and measured toluene concentration (dashdot line) for shore communities (A, B and C) and for offshore communities (D, E and F).**

A, D; correspond to the modelled biomass (solid line) and the modelled substrate (dashed line) in  $\mu\text{g}$  of carbon per litre. B, E; correspond the modelled biomass (solid line) and observed density in cell per ml in first (triangles) and in the second chemostat (circles); C, F; correspond to the modelled

production (solid line) and the observed production in pmol of incorporated leucine in first (open symbols) and in the second chemostat (filled symbols)

## Discussion

Perturbations caused by environmental fluctuations or by human activity could result in temporary malfunctioning of the microbial loop. The resilience of the remineralization (i.e. bacterial production) after a temporary shock can be due to numerous species or to a few key species. However, these key species may have different properties in coastal and in offshore environments.

This study investigated the resilience of bacterial production (ability to recover from a perturbation) of coastal and offshore bacterial communities following a toluene shock in duplicates. The bacterial production was followed by leucine incorporation, as it is a powerful technique to estimate carbon flux (Buesing and Marxsen, 2005a) and the structure of the community was monitored by SSCP. It should be noted that since this study focuses on the bacterial resilience and not on reproducing natural conditions, grazers were removed by filtration.

Both coastal and offshore communities showed a peak of bacterial production 3 days after the toluene shock and this coincides with dominance of a single SSCP peak assigned as *Alteromonas sp.*, which is therefore a key species for functional resilience. A model was designed to understand if this after-shock production could quantitatively be explained by assimilation of the organic matter released by the toluene shock. This model suggests that the strain coming from offshore water has a different reaction than the strain from coastal waters to a brutal nutrient availability.

### *Before the toluene shock*

In the offshore communities, *Alteromonas* became rapidly dominant whereas this was only observed after the shock for shore communities. Interestingly, *Alteromonas* can respond quickly, even after extended period of starvation (Lebaron and Joux, 1994) and it became frequently dominant in mesocosms where seawater was pumped continuously (Pukall et al., 1999, Schafer et al., 2000, Massana and Jurgens, 2003), showing that species at low abundance might become important to understand the reaction to changing conditions. *Alteromonas* can develop, especially in the absence of predators (Beardsley et al., 2003). In coastal communities, the structure remain rather complex, even if a strong confinement effect is visible as previously studied (Ferguson et al., 1984, Lee and Fuhrman, 1991, Schafer et al., 2000). We assume that there were a few *Alteromonas* in both coastal and offshore seawater, as it is a well-spread phylotype (Garcia-Martinez et al., 2002) that can multiply rapidly. The higher production of the communities dominated by *Alteromonas* bacteria suggest that their bacterial yield is high, while shore communities have high carbon flow into respiration.

### *After the toluene shock*

Toluene was added at day 13, so that an inert biomass would have been divided by 1.68 because of dilution. Therefore, it is unlikely that important populations were totally washed out before the shock. Since toluene is soluble in water (0.38 g L<sup>-1</sup> at 20°C) and interacts with cell membranes, all bacteria

are likely to be affected. In our experiments, the toluene shock inhibited totally the bacterial production and the richness decreased drastically (Figure III.3-3). Interestingly, *E.coli* cells exposed to a similar concentration of toluene lost the ability to synthesise proteins concomitantly with a release of RNA and proteins in the media, even though their membranes were not disrupted (Jackson and DeMoss, 1965). Since toluene was rapidly removed in our experiments by physical ways after 24 hours, the potential assimilation of the toluene is unlikely to play a major role, even if some bacteria were reported to grow slowly with reduced yields on small concentration of toluene (Volkers et al., 2006). In our experiment, the main effect of the toluene is likely to be cell lysis and the release of patchy organic matter. However, it seems that one species out compete the others after the shock. A similar mechanism was observed in multitrophic experimental aquatic food webs in which resilient communities showed dominance by a minority of species after the shock (Steiner et al., 2006).

#### *Alteromonas is the favoured species*

In our experiment, the shock favoured a large, high yield, HNA *Alteromonas* sp. strain in all chemostats (Figure III.3-3 M-R), even though the abundance of *Alteromonas* was low at the beginning of the experiment (Figure III.3-3 A,G and M). This is consistent with studies showing that *Alteromonas* sp. is a large, rRNA-rich widespread bacterial species representing less than 1% of the total cell count *in situ* (Eilers et al., 2000a, Eilers et al., 2000b, Garcia-Martinez et al., 2002).

Numerous observations are consistent with this dominance of *Alteromonas* cells after a shock: First, larger cells like *Alteromonas* can assimilate more substrate per cell and unit time. Second, *Alteromonas* is known to grow rapidly, especially in absence of grazers (Beardsley et al., 2003). Third, it can respond rapidly to changing conditions (Gasol), for example to an enrichment (Eilers et al., 2000a), especially when the substrate is patchy (Perthaler et al., 2001).

#### *Confrontation with a simple model*

As shown in Figure III.3-2, we saw that the functional recovery was quicker in offshore communities. However, this quicker reaction could be due to the higher abundance of *Alteromonas* before the shock in the offshore communities. To test to what extent this quicker reaction was due to the dominance of *Alteromonas* before the shock, we built a model based on processes that simulate continuously the cellular biomass and the available substrate using parameters taken from literature (Table III-2). This procedure tests the following underlying mechanism, inspired from Nayar et al. (2005) about phyto- and bacterio- plankton exposed to diesel fuel where the lytic activity increases the available organic matter : *Alteromonas* bacteria, which are less sensitive to the shock and able to assimilate more quickly newly available substrate, take advantage of the newly released organic carbon to proliferate. Therefore, the speed of recovery depends on the abundance of *Alteromonas* before the shock. In this model, toluene has a lytic activity while effects on bacterial yield (Volkers et al., 2006) are neglected. As can be seen on Figure III.3-4, our model captures the observations of the shore communities quite well with realistic parameter values (Table III-2). The slight gap between the modelled and the observed bacterial density at the end of the experiment could be explained by an imperfect conversion factor between relative SSC and carbon content. One strong argument in this direction has been

reported by Neumann et al. (2005): some species (*Pseudomonas putida*), which also have an outer membrane of lipopolysaccharide, adapt to toxic organic compounds by increasing their size. However, the model was unable to fit to experimental data for offshore communities that were dominated by *Alteromonas sp* (Figure III.3-4). This would seem that the reaction of *Alteromonas* from the offshore environment did not recover as fast as their abundance before the shock would be theoretically expected. In other words, individual cells of the offshore *Alteromonas* strain have delayed reactions in comparison with the cells coming from the shore, even though they had similar 16S. However, some strains with very different properties can have the same 16S (Jaspers and Overmann, 2004). One hypothesis is that shore strains are more adapted to perturbations because they regularly experience them (Xing et al., 1997a, Jaspers and Overmann, 2004, Militza et al., 2006, Weinbauer et al., 2006). Another possibility is that the physiological state of *Alteromonas* was different in coastal and offshore communities, thereby inducing different response to the shock (Berney et al., 2006).

#### *Comparison with resilience of other systems*

In our study, the function of the bacterial community could recover prior to the structure, as was also the case in denitrifying biofilms (Gentile et al., 2006), whereas the resilience of the structure was not observed. This might be due to the short time scale (20 days) or to the absence of predators, which prevents some mechanism of the resilience occurring in the complete ecosystem. Indeed, the rapid growth response of *Alteromonas sp.* to changing environmental conditions may be counterbalanced by higher grazing by flagellates *in situ* (Lebaron et al., 1999, Beardsley et al., 2003, Mohapatra and Fukami, 2004). Generally, predators can affect greatly the return time of the prey, but the link between predators and resilience of the prey is complex (Cottingham and Schindler, 2000, Ovreas et al., 2003, Cottingham et al., 2004). For example, this link depends on which predators and which preys are considered (Vazquez-Dominguez et al., 2005).

In conclusion, this study demonstrated the strong positive reactivity of bacterioplankton after a shock. In coastal and offshore communities, this reactivity can be explained by a nutrient release that an opportunistic *Alteromonas sp.* assimilates. Both communities had therefore the same key species for resilience. However, the mathematical model that assembles the experimental data quantitatively suggests that the offshore *Alteromonas* strain was not able to respond as fast as the strain from coastal waters considering the high abundance of *Alteromonas* in the offshore communities before the shock. We suggest that life strategy of the coastal strain is more adapted to brutal nutrient availability. Further experiments are required to understand how the predation of *Alteromonas* cells changes the functional resilience of the system.



### **III.4. Résultats complémentaires et discussion**

#### **III.4.1. Limitation du contexte de l'étude**

Les chemostats sont des outils performants pour étudier les bactéries hétérotrophes du milieu marin en environnement contrôlé. Cependant, les résultats obtenus doivent être interprétés avec précaution si l'incubation est longue. En effet, lorsqu'elles sont isolées dans des mésocosmes, les communautés marines évoluent rapidement vers une communauté plus simple et comportant plus d'espèces cultivables (Ferguson et al., 1984, Lee and Fuhrman, 1991, Schafer et al., 2000, Lebaron et al., 2001b, Winter et al., 2004, Lopez-Flores et al., 2006).

De plus, nos expériences se centrent sur la résilience de la communauté bactérienne dans les conditions particulières du chemostat, qui ne comportent pas de prédateurs. Il serait intéressant de voir dans quelle mesure l'introduction de ce niveau trophique supérieur modifie la résilience des communautés bactériennes car ceci serait beaucoup plus proche des conditions rencontrées en milieu naturel. Par exemple, les prédateurs peuvent consommer les cellules de taille « moyenne » de façon préférentielle (Pernthaler, 2005, Pernthaler and Amann, 2005), ce qui pourrait modifier la dominance des cellules d'*Alteromonas* après le choc de toluène.

#### **III.4.2. Variation du volume cellulaire dans nos chemostats sans prédateurs**

Bien que les bactéries soient souvent considérées comme une boîte noire où tous les acteurs sont approximativement équivalents (Curtis and Sloan, 2006, Sloan et al., 2006), les cellules bactériennes sont très diverses en terme de métabolisme et de taille. Des cellules de grande taille se sont développées dès le début dans les chemostats inoculés avec des communautés du large et après le choc toluène pour les chemostats inoculés avec des communautés du large.

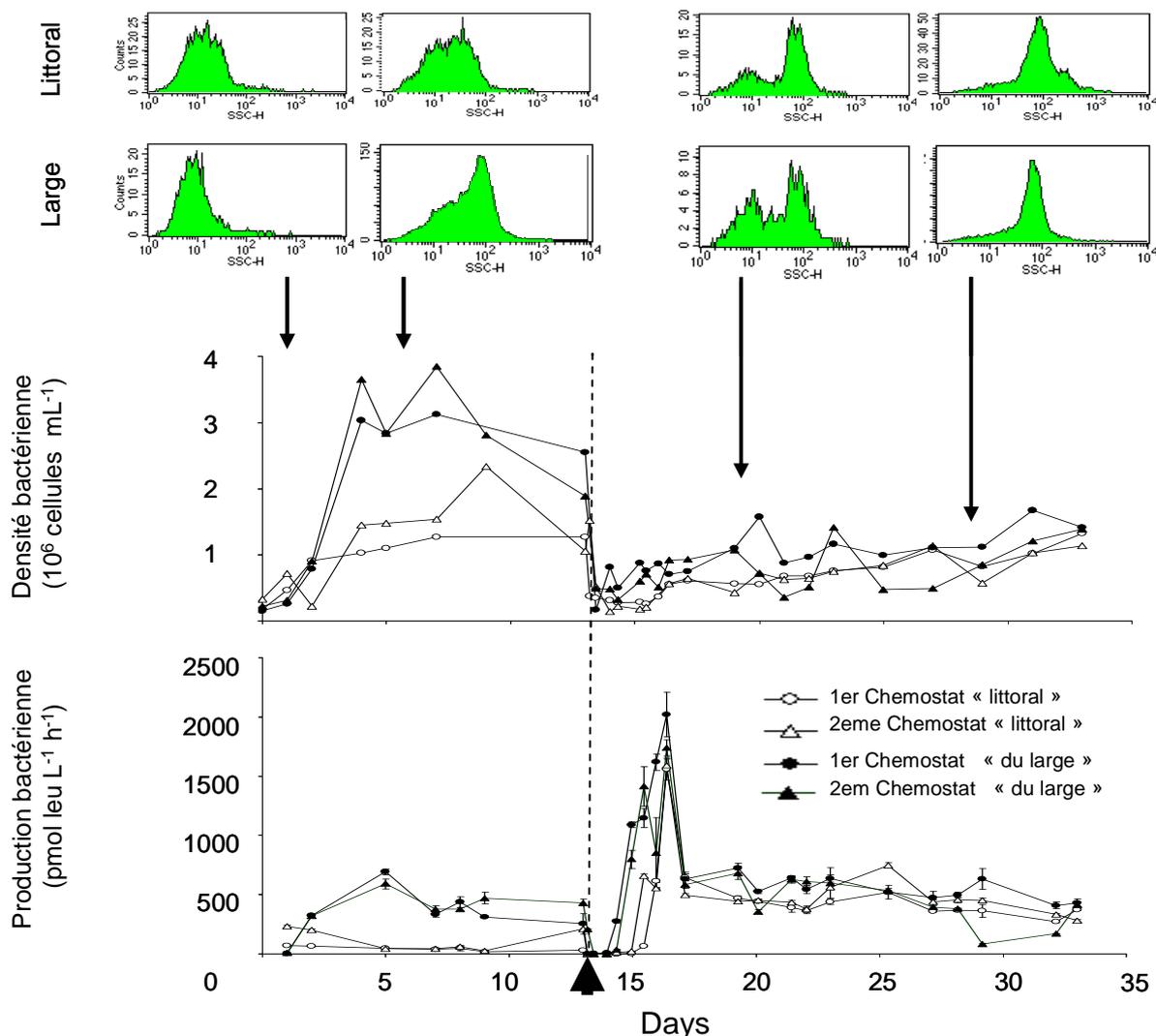


Figure III.4-1 : Variation du paramètre SSC-H (taille cellulaire) au cours de l'incubation

En haut, la distribution des événements de cytométrie en fonction d'un paramètre dépendant de la taille de la cellule (side scatter, SSC-H) pour un chemostat représentatif du littoral et pour un chemostat représentatif du large ; au milieu, densité bactérienne (nombre d'événements par cytométrie par unité de volume) ; en bas, production bactérienne estimée par l'incorporation de leucine radioactive.

### III.4.3. La reproductibilité de la surproduction après un choc toluène

L'expérience décrite dans le III.3 a été reproduite selon les mêmes matériels et méthodes, mais un plan d'expérience légèrement différent : le choc de toluène a été appliqué au jour 39 et deux chemostats ont servi de témoins sans application de toluène. De plus, le soutirage du toluène a varié entre les deux chemostats, rendant toute comparaison quantitative difficile. Nous allons brièvement présenter ces résultats et les discuter.

La première constatation est que lorsque les communautés sont maintenues en chemostat pendant un temps prolongé, *Alteromonas* peut dominer les communautés. Cette dominance est un

problème majeur pour étudier les communautés en mésocosmes (Pukall et al., 1999, Schafer et al., 2000, Massana and Jurgens, 2003).

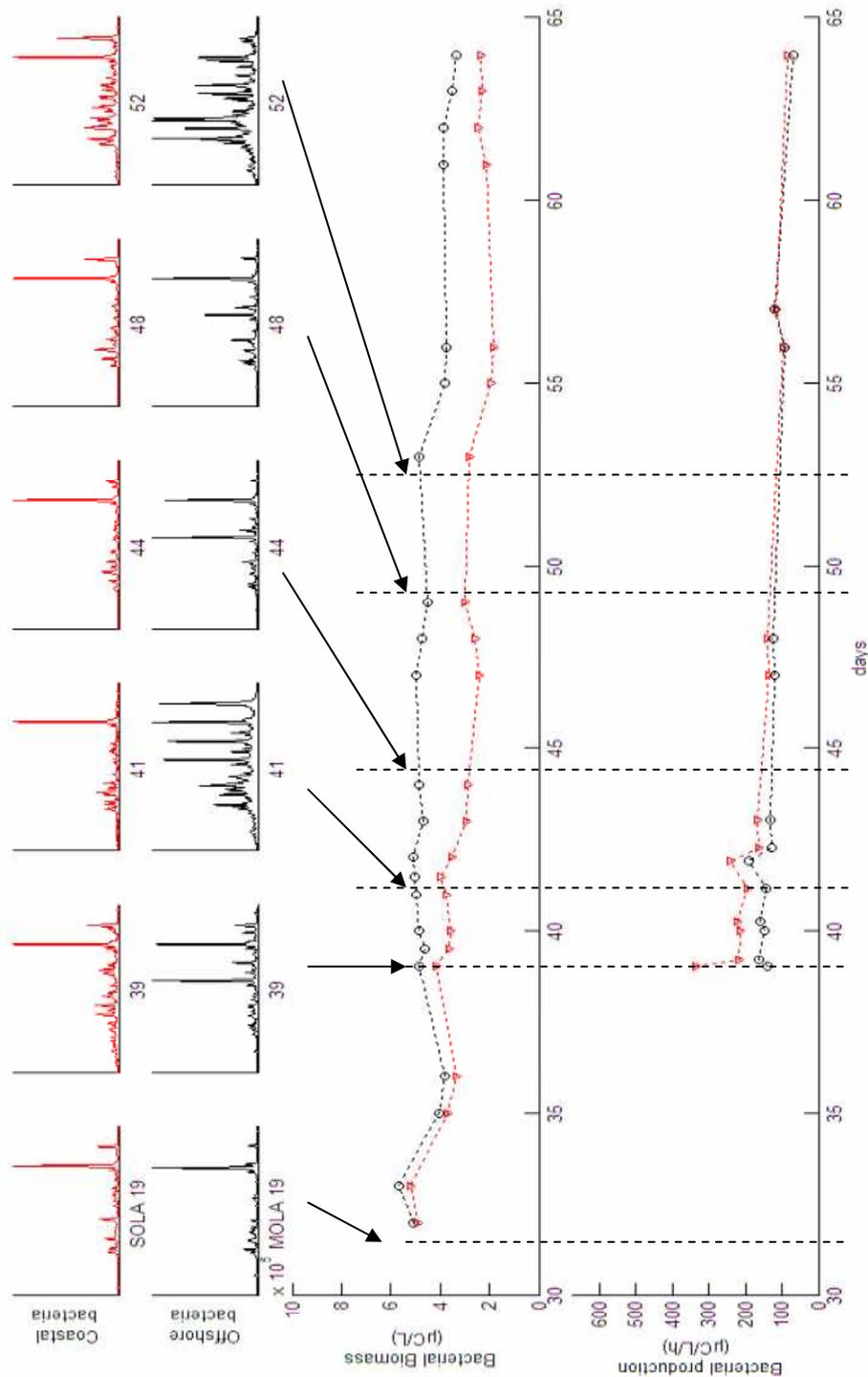
Les chemostats témoins n'ayant pas subi le choc ont une incorporation de carbone et une densité bactérienne stable, mais la composition de la communauté change, bien qu'aucun choc volontaire n'ait été appliqué au jour 39 (Figure III.4-2).

Nous interprétons ce changement de structure comme la conséquence d'une concentration indétectable de toluène ayant contaminé les chemostats contrôles. En effet, les quatre chemostats étaient localisés dans la même pièce. Lors de l'évacuation du toluène par bullage, il est donc possible qu'une faible fraction ait contaminé les chemostats contrôles par la phase gazeuse. Cependant, malgré cela, nous observons un pic après ce petit choc.

Malgré ce problème de manipulation, nous pouvons conclure de ces chemostats « contrôles » que :

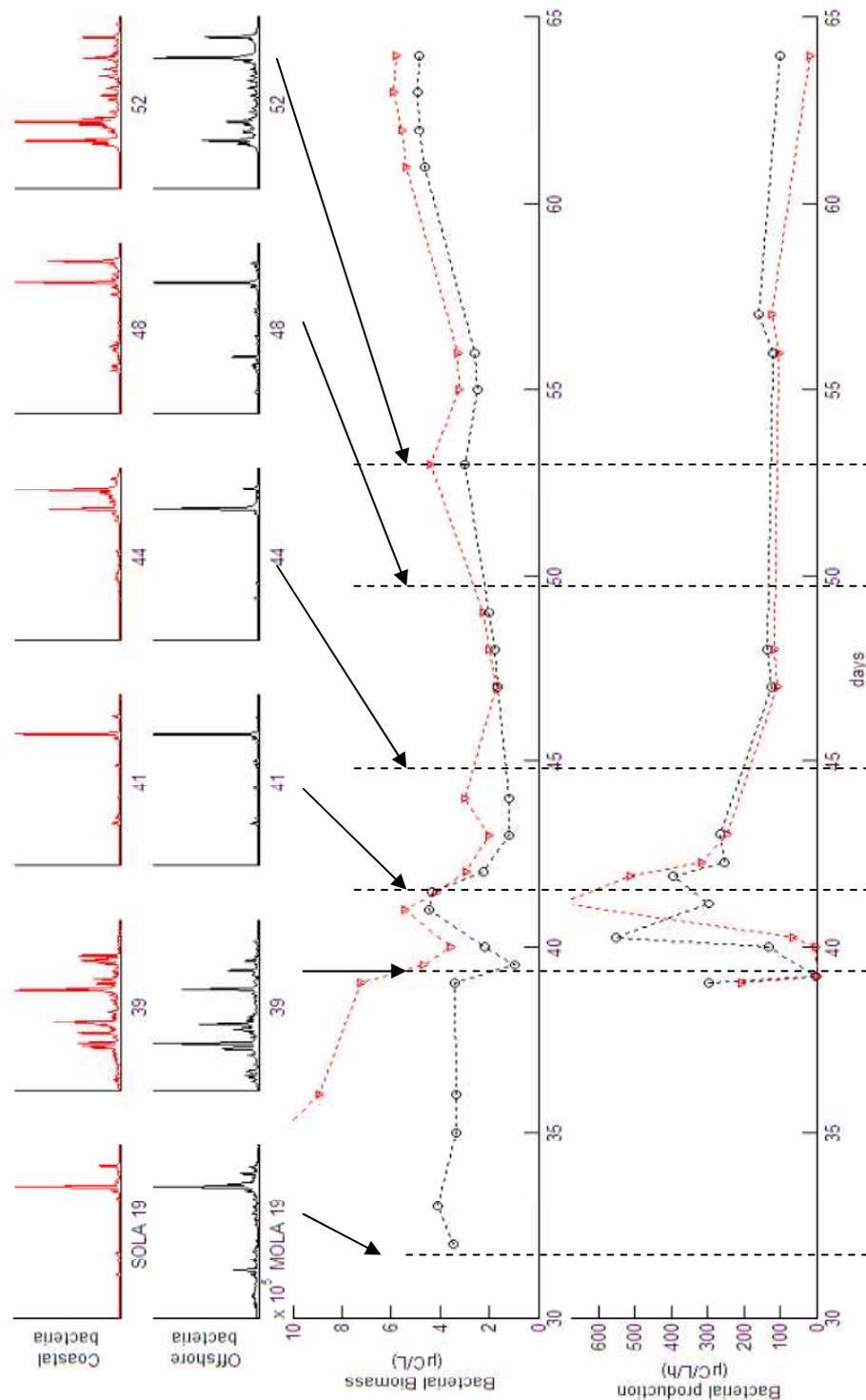
- La structure des populations a réagi de façon plus fine que la fonction globale d'incorporation de carbone en biomasse.
- La structure de la population est complexe 52 jours après l'inoculation, et diffère selon que l'inoculum provient de l'environnement littoral ou du large.

Dans les chemostats ayant subi le choc de toluène, la composition de la communauté change radicalement et l'incorporation de leucine est nulle. Deux jours après le choc, la densité bactérienne et la production atteignent temporairement une valeur importante. Le nombre de cellules diminue alors brusquement, avant d'augmenter à nouveau. Les cinétiques de retour de ces deux chemostats ne sont pas comparables car l'élimination du toluène est plus tardive dans les chemostats stables que dans les chemostats perturbés (Figure III.4-4).



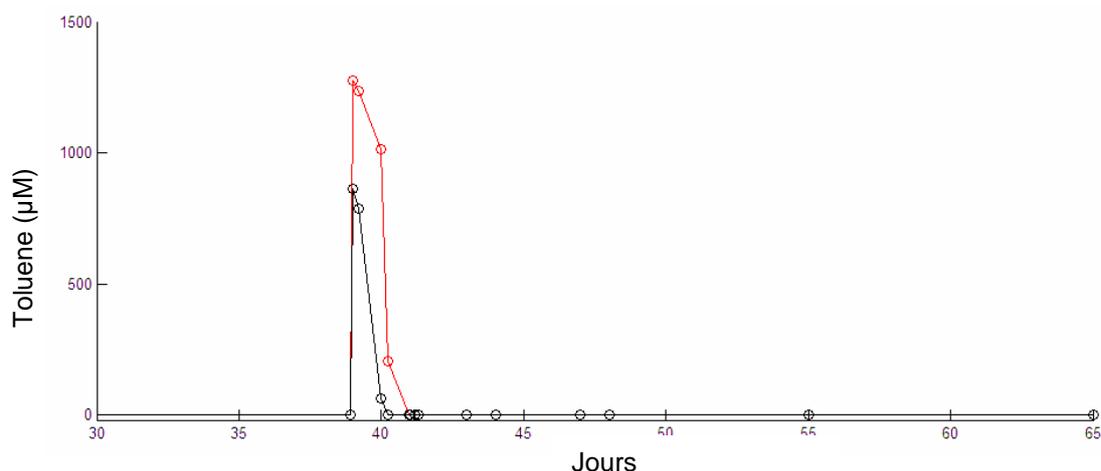
**Figure III.4-2 : Composition et activité dans les chemostats sans choc toluène**

Pour deux chemostats maintenus dans des conditions stables ; en haut , composition des communautés prélevées en environnement littoral et en environnement du large ; au milieu , Biomasse des communautés bactériennes estimée par cytométrie ; en bas , Production des communautés bactériennes estimée par incorporation de leucine radioactive.



**Figure III.4-3 : Réactions de consortia marins à différents chocs de toluène**

*Pour deux chemostats exposés à un choc toluène au jour 39 : Haut , composition des communautés prélevées en environnement littoral et en environnement du large ; Milieu , Biomasse des communautés bactériennes estimée par cytométrie ; Bas , Production des communautés bactériennes estimée par incorporation de leucine radioactive.*



**Figure III.4-4 : Concentrations de toluène différentes dans deux réacteurs**

La concentration de toluène par spectrofluorométrie dans les deux chemostats. Les cercles représentent les mesures. Entre les mesures, une interpolation linéaire est représentée (ligne).

Notre expérience montre la même résilience générale que la première (production bactérienne inhibée puis surproduction lorsque le toluène est éliminé par des moyens physiques), mais *Alteromonas* est rapidement régulée au profit d'une communauté complexe. La variation d'abondance au cours du temps fait songer à une régulation virale.

L'hypothèse de la régulation virale a été avancée pour la première fois par Thingstad et Lignell sous le nom de « killing the winner » en 1997 (Thingstad and Lignell, 1997). Cette hypothèse offre une explication séduisante pour expliquer le grand nombre d'espèces bactériennes par rapport au faible nombre de substrats limitants. L'idée fondamentale est que lorsqu'une population bactérienne devient très abondante, elle est régulée par un phage lytique. Ainsi, malgré un faible nombre de substrats limitants, le grand nombre d'espèces bactériennes ne serait plus un paradoxe (Hutchinson, 1961).

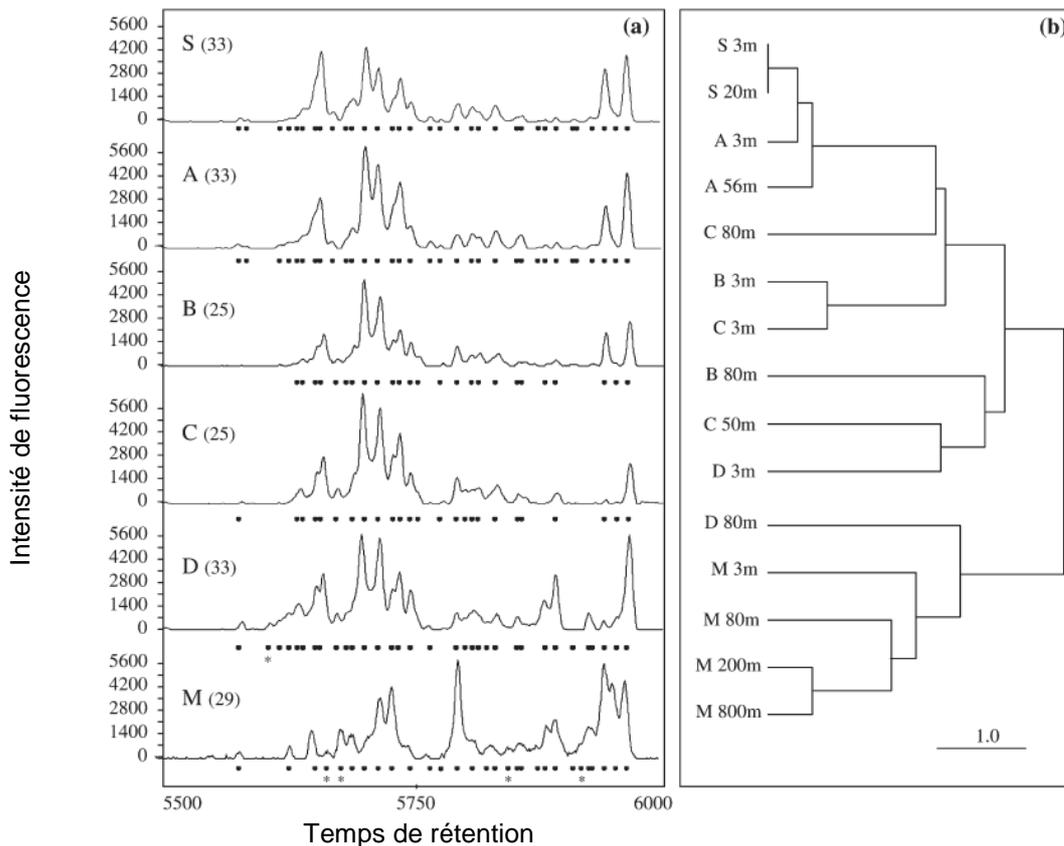
Cette hypothèse a été testée dans des chemostats où quatre couples bactéries-bactériophages ont été mis en contact. Bien que l'abondance relative finale des différentes espèces soit similaire dans le témoin et dans le chemostat où des virus ont été ajoutés, une lyse virale est constatée après l'addition des virus (Middelboe et al., 2001). Il est par conséquent possible qu'après un choc toluène, une souche opportuniste devienne très abondante, et soit régulée par son virus spécifique. Cette hypothèse est une piste de réflexion quant à la décroissance brutale de la densité bactérienne au jour 41 (Figure III.4-3). Nous remarquons toutefois que cette décroissance n'est pas significative dans les témoins. Cette hypothèse doit être considérée avec d'autant plus de prudence que la décroissance brutale d'*Alteromonas* n'a pas été observée lors de la première expérience.

### **III.5. Différences de compositions entre SOLA et MOLA**

Nous avons vu que les communautés SOLA et MOLA ont des structures initiales différentes mais réagissent toutes deux par la prolifération d'un même phylotype après un choc toluène transitoire. De façon intéressante, la structure des communautés bactérienne évolue de façon

continue entre SOLA et MOLA (Figure III.5-1), si bien qu'il est possible qu'un même phylotype soit présent à SOLA et à MOLA.

En conclusion, les empreintes moléculaires réalisées montrent une structure de communautés différente. Cette différence peut être due à des événements qui ont orienté la communauté. Les événements physico-chimiques enregistrés à SOLA sont à la fois plus fréquents et de plus grande amplitude. C'est ce que nous allons détailler dans le paragraphe suivant.



**Figure III.5-1 : Variation spatiale de la structure des communautés marines entre SOLA et MOLA (Ghiglione et al., 2005)**

S,A,B,C,D et M correspondent à des points de prélèvements d'eau en mer méditerranée de plus en plus éloignés de la côte (Figure III.2-1) ; a, les profils SSCP des différents prélèvements. Le nombre entre parenthèses correspond au nombre de pics détectés par Genscan® avec un degré polynomial de 10. Les points noirs sous les profils relèvent la présence d'un pic; b, correspond au dendrogramme de similarité construit à partir des aires de pics fournies individuellement pour chaque profil par Genscan® ; les pics des différents profils sont récapitulés manuellement dans un tableau qui sert de base au logiciel SYSTAT 5.2.1 (dendrogrammes construits par UPGMA).

### **III.6. Différences d'histoires entre SOLA et MOLA**

La station SOLA fait partie d'un réseau national d'observation du milieu littoral depuis 1997, ce qui permet de suivre l'évolution de paramètres physico-chimiques sur une base régulière : la

température, la salinité, l'oxygène, le pH, l'ammonium, les nitrates, les nitrites, le phosphate, les matières en suspension, le carbone organique particulaire et la chlorophylle a (Figure III.6-1). Ce suivi suggère que les conditions « perçues » par les communautés bactériennes prélevées à SOLA ont été fluctuantes sur plusieurs gammes de temps (de l'échelle hebdomadaire à l'échelle de l'année).

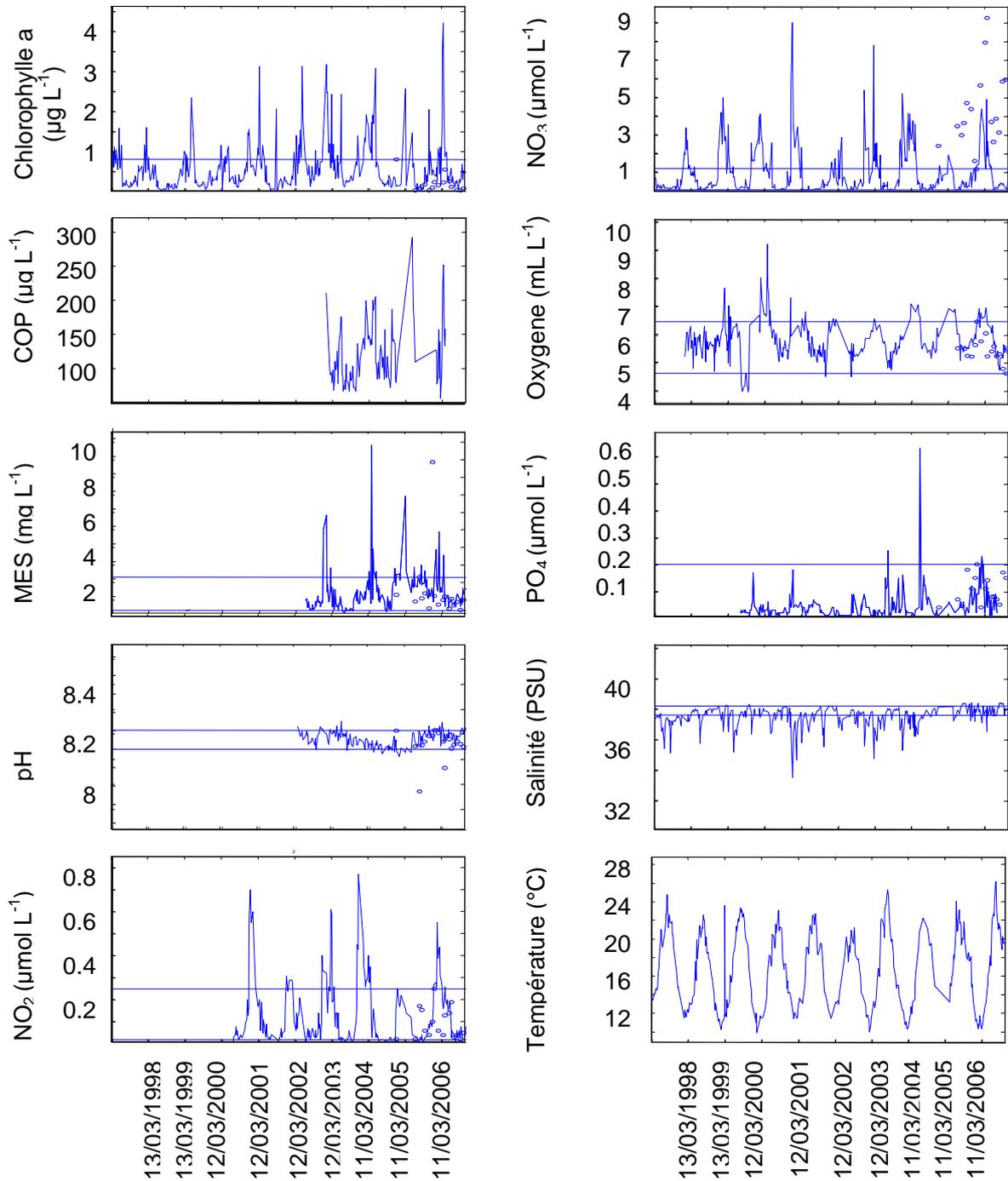


Figure III.6-1 : Fluctuations de quelques paramètres perçus par les bactéries à SOLA

Les données littorales (trait continu) sont fournies par le réseau national d'observation SOMLIT : chlorophylle a, Carbone Organique Particulaire (COP), Matière en suspension (MES), pH,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$ , Oxygène,  $\text{PO}_4$ , Salinité et Température pour le site SOLA de la baie de Banyuls entre les années

1997 et 2006. Voir le site [www.domino.u-bordeaux.fr/somlit\\_national](http://www.domino.u-bordeaux.fr/somlit_national) pour les protocoles de mesures. Les données MOLA sont gracieusement fournies par l'équipe de surveillance du laboratoire, dont notamment E.Maria, JJ Naudin, et F.Lantoine. Les traits horizontaux indiquent les extremums observés à MOLA. Pour la salinité, les extremums reportés sont ceux relevés par F.Lantoine entre 1991 et 1993.

La station MOLA fait l'objet d'un suivi plus récent et plus difficile en raison de son éloignement. Un projet de bouée automatique est en train de se mettre en place afin d'avoir un recul similaire à cette station qui est placée sur le courant liguro-provençal.

### III.7. Conclusion quant à la résilience du bactérioplancton marin

Les communautés du large évoluent rapidement dans les conditions imposées par la culture en chemostat. Elles sont dominées par une population d'*Alteromonas*. Néanmoins, les populations majeures ne sont pas lessivées si le choc intervient après un temps plus court que le temps de séjour hydraulique. En comparaison, les communautés littorales restent composées de beaucoup d'espèces.

A l'addition de toluène, la production et la densité bactérienne chutent. Elles reprennent lorsque le toluène a été éliminé par des moyens non biologiques. La production devient temporairement très importante à cause de l'assimilation rapide du substrat par *Alteromonas* puis retourne vers un équilibre. Cette dynamique générale a été observée dans tous les chemostats soumis à un choc toluène ce qui laisse supposer qu'*Alteromonas* est une espèce clé dans la résilience de la production bactérienne (Figure III.7-1).

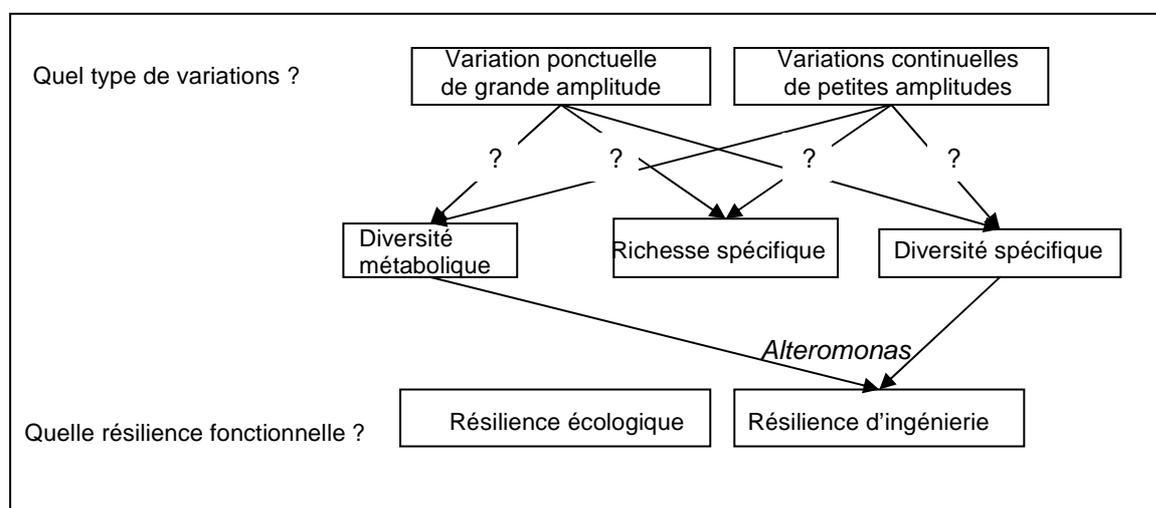


Figure III.7-1 : Mécanismes de résilience dans les communautés marines

*Mécanismes de résilience mis en évidence dans le milieu marin : des communautés d'histoire et donc de structure différente ont eu la même réaction à un choc [prolifération d'Alteromonas]*

*Alteromonas* est un genre très répandu dans le milieu marin bien qu'il soit relativement peu abondant (moins de 1% du nombre total de cellules bactériennes) (Eilers et al., 2000b, Garcia-Martinez et al., 2002). Les cellules de ce genre deviennent souvent dominantes dans des chemostats où des nutriments variés deviennent disponibles (Eilers et al., 2000a, Pernthaler et al., 2001), en particulier lorsque les prédateurs naturels sont absents (Beardsley et al., 2003).

Lorsqu'un choc survient, la reprise de l'activité est plus rapide dans les communautés du large. Cependant, pour un même choc de toluène, la reprise est proportionnellement moins rapide dans les communautés du large que dans les communautés littorales si on tient compte de la dominance d'*Alteromonas* dans les communautés du large avant le choc.

Notre interprétation par un modèle suggère que la souche d'*Alteromonas* qui devient dominante dans les systèmes littoraux n'a pas les mêmes propriétés de croissance que la souche dominante dans les systèmes du large. Une conclusion similaire a été avancée par Weinbauer à propos de souches de *Vibrio*- et de *Rhodobacter*. La souche de *Vibrio* de l'environnement littoral serait

plutôt un stratège « r » capable de réagir rapidement à une variation de matière organique dissoute tandis que *Rhodobacter* serait plutôt un stratège « K » (Weinbauer et al., 2006).

Il semble donc que des communautés façonnées par l'histoire littorale aient une résilience d'ingénierie différente des communautés façonnées par l'histoire perçue par le courant liguro-provençal. Entre autres différences, l'histoire littorale est caractérisée à la fois par des variations ponctuelles de grande amplitude et par des variations continues d'amplitude réduite, chaque événement météorologique ayant plus d'impact sur l'environnement littoral (faible profondeur, apports organiques terrestres) que sur l'environnement du large par une profondeur de 80 mètres.

### **III.8. Développements potentiels du modèle « milieu marin »**

Nous avons montré qu'*Alteromonas* se développait après un choc temporaire lorsqu'il n'y a pas de prédateurs. Cette absence de prédateurs nous a permis d'attribuer les différences de réactions observées entre les communautés du littoral et du large à des propriétés bactériennes différentes. Cependant, l'impact des prédateurs sur la résilience peut s'avérer passionnant, d'autant plus que des études mettent en évidence une prédation par broutage intense des cellules d'*Alteromonas* (Beardsley et al., 2003). Il serait par conséquent intéressant de comparer la résilience d'un système avec des ciliés d'un système sans ciliés. Un autre type de prédateur qu'il serait intéressant de suivre seraient les virus. Il est expérimentalement lourd mais techniquement possible de suivre et de caractériser les populations virales des bactéries cultivables (Annexe 1).

D'autre part, notre interprétation à l'aide de modèles suppose qu'*Alteromonas* est présent sur les deux sites de prélèvement. Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse en dénombrant *Alteromonas* sur les deux sites pendant une année. En particulier, il serait extrêmement intéressant de voir si la densité d'*Alteromonas* augmente consécutivement à un apport de nutriments avant d'être régulée par les ciliés. Dans un premier temps, il serait possible d'échantillonner à haute fréquence près de la côte après une pluie importante (apport de matière organique terrestre importante). Pour quantifier la régulation par les ciliés, il serait envisageable de comparer l'évolution d'*Alteromonas* dans des sacs de dialyse *in situ* sans ciliés à des sacs de dialyse inoculés avec des ciliés.

Il est difficile d'étudier le consortium marin sur de longues périodes dans des chemostats à cause de l'effet confinement. Il est par conséquent difficile d'influencer l'histoire des communautés marines pour étudier l'impact de l'histoire sur l'espèce clé qu'est *Alteromonas*. Une culture pure d'*Alteromonas* sur une longue période en milieu fluctuant aurait pu apporter des éléments de réponse quant à des états physiologiques différents ou quant à l'appartenance à des écotypes différents.

Cependant, une culture pure n'est probablement pas représentative de l'ensemble des phénomènes pouvant survenir dans un consortium complexe. Nous avons donc cherché un consortium complexe pour pouvoir étudier l'effet structurant des fluctuations continues de « petite » amplitude de l'environnement sur les espèces clés pour la résilience fonctionnelle.

Un des consortia complexes les plus manipulés est le consortium de la digestion anaérobie. Un digesteur anaérobie présente les caractéristiques idéales pour tester l'effet structurant des variations continues de petite amplitude sur la résilience fonctionnelle d'un consortium complexe et c'est ce dont nous discutons dans le chapitre suivant.

## CHAPITRE IV : Résilience de digesteurs anaérobies soumis à un choc acide

<b><u>IV.1. INTRODUCTION .....</u></b>	<b><u>134</u></b>
IV.1.1. PRELIMINAIRE	
IV.1.2. LE CONSORTIUM DE LA DIGESTION ANAEROBIE	
<b><u>IV.2. CONTEXTE EXPERIMENTAL DE LA DIGESTION ANAEROBIE POUR ETUDIER L'EFFET DE PETITES PERTURBATIONS.....</u></b>	<b><u>138</u></b>
IV.2.1. LES AVANTAGES DE LA DIGESTION ANAEROBIE EN CHEMOSTAT SEMI- CONTINU	
IV.2.2. DESCRIPTION DE NOTRE DISPOSITIF EXPERIMENTAL	
<b><u>IV.3. ECOLOGICAL RESILIENCE ENHANCED BY PERTURBATIONS IN ANAEROBIC BIOREACTORS .....</u></b>	<b><u>143</u></b>
<b><u>IV.4. RESULTATS COMPLEMENTAIRES ET DISCUSSION .....</u></b>	<b><u>157</u></b>
IV.4.1. DES SYSTEMES DYNAMIQUES AVANT LE CHOC ACIDE	
IV.4.2. DES SYSTEMES « DIVERGENTS » AVANT LE CHOC ACIDE	
IV.4.3. DETAIL DES CHOCS ACIDES	
IV.4.4. FLOCS, BIOFILM ET CELLULES LIBRES PENDANT LE CHOC	
IV.4.5. COHERENCE DES INDICATEURS FONCTIONNELS APRES LE CHOC	
IV.4.6. REACTION DIFFERENTE DES GROUPES MICROBIENS APRES LE CHOC ACIDE	
<b><u>IV.5. CONCLUSIONS SUR L'ECOSYSTEME DIGESTION ANAEROBIE .....</u></b>	<b><u>169</u></b>
<b><u>IV.6. DEVELOPPEMENTS POTENTIELS MODELE « DIGESTION ANAEROBIE ».....</u></b>	<b><u>169</u></b>

## **IV.1. Introduction**

### **IV.1.1. Préliminaire**

Le chapitre précédent et l'exemple des consortia anaérobies détaillé au paragraphe I.2.2.2 (Figure I.2-5) démontre que certaines communautés ont des histoires différentes qui engendrent une structure et/ou des propriétés physiologiques différentes, ce qui a pour effet de changer les caractéristiques de résilience fonctionnelle. Nous avons vu que dans le cas des communautés marines, les communautés SOLA subissaient à la fois des fluctuations de grande amplitude de façon occasionnelle et à des fluctuations de petite amplitude à intervalle rapproché. Dans ce chapitre, nous exploitons des systèmes microbiens dont l'entretien sur une période d'expérimentation relativement longue est possible: les boues anaérobies de stations d'épuration. Nous souhaitons tester l'effet de fluctuations environnementales continues de petite amplitude (« petites perturbations ») sur la résilience fonctionnelle. Dans ce chapitre, nous allons présenter une vue d'ensemble de la digestion anaérobie et des conditions où elle est effectuée dans notre contexte expérimental, avant de présenter les résultats principaux concernant la résilience fonctionnelle sous forme d'article (soumis à Environmental Microbiology).

### **IV.1.2. Le consortium de la digestion anaérobie**

#### *IV.1.2.1. La fonction d'un système de dépollution*

Les consortia microbiens de dépollution font l'objet d'une grande attention en raison de leur utilité pour l'homme. Ces consortia peuvent être aérobies ou anaérobies. Les consortia aérobies sont plutôt utilisés pour séquestrer le carbone, l'azote et le phosphate dans les boues, qui peuvent être ensuite éliminées. Ils peuvent également être utilisés pour éliminer des composés toxiques précis (Manefield et al., 2005). Les consortia anaérobies peuvent potentiellement dégrader toute matière organique tout en minimisant le volume de boues générées car une partie de la matière est évacuée sous forme de gaz qui peut être valorisé indépendamment.

Pour assurer cette fonction, trois étapes sont essentielles : L'hydrolyse des macromolécules, puis l'acidogénèse, qui transforme ces macromolécules en acides gras volatiles et la méthanogénèse, qui achève l'oxydation de ces acides gras volatiles en CO<sub>2</sub> et CH<sub>4</sub> (Figure I.1-1).

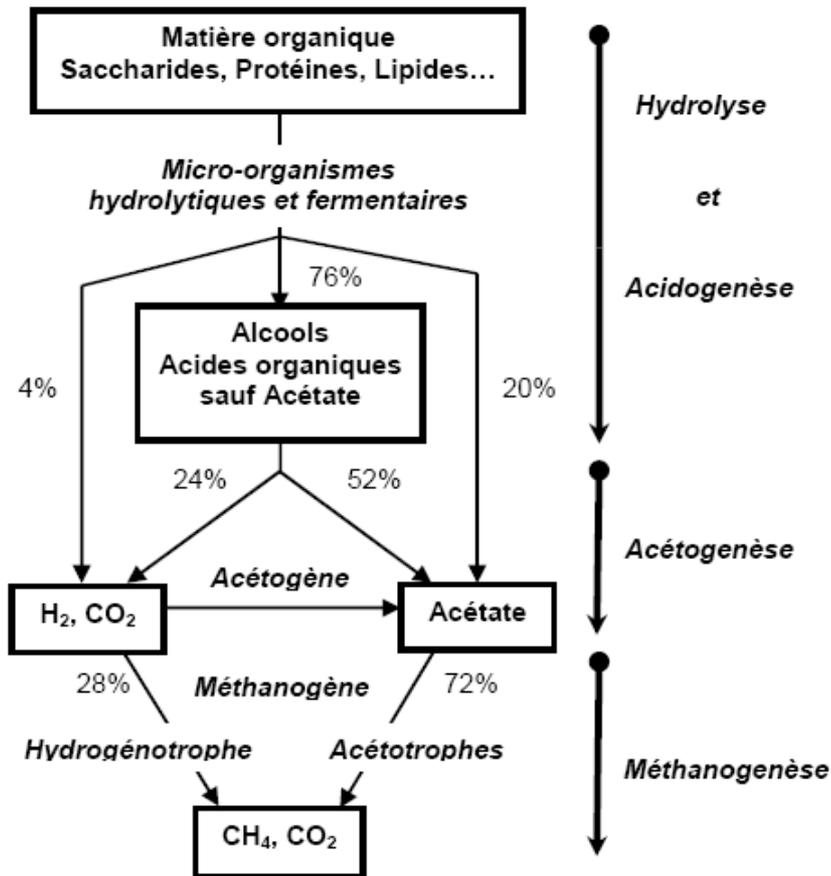


Figure IV.1-1 : Modèle de digestion anaérobie de Zeikus (Zeikus, 1980)

La matière organique complexe est dégradée en alcools, acides organiques, hydrogène et dioxyde de carbone par les micro-organismes hydrolytiques et fermentaires. Les alcools sont dégradés en hydrogène et dioxyde de carbone ou bien en acétate. L'hydrogène et le dioxyde de carbone peuvent être assimilés en produisant du dioxyde de carbone et du méthane par les micro-organismes hydrogénéotrophes. L'acétate peut être assimilé par les organismes acétotrophes pour former du dioxyde de carbone et du méthane.

#### IV.1.2.2. La réaction du consortium anaérobie en cas de choc

Les chocs susceptibles de survenir en digestion anaérobie font l'objet d'un enjeu économique majeur. La réponse fonctionnelle de digesteurs anaérobies en réaction à un choc est par conséquent bien documentée, bien que la diversité des mesures relatives à la stabilité et la diversité des systèmes étudiés rendent les comparaisons parfois délicates (Leitao et al., 2006b). Le pH est un inhibiteur majeur de la digestion anaérobie ce qui a été pris en compte dans le modèle de Angelidaki et al. (1999) représenté sur la Figure IV.1-2. Il est maintenant bien établi que la digestion anaérobie est optimale entre les pH 6.3 et 7.8 (Vanhaandel, 1994).

La digestion anaérobie peut être modélisée de différentes façons en partant du réseau de Zeikus (1980). Par exemple, le modèle de Moletta ne considère que deux étapes clés : l'acétogénèse

et la méthanogénèse (Moletta et al., 1986). Cependant, on peut distinguer l'acétate et le propionate parmi les acides organiques produits (Gavala et al., 1996), ce qui précise le modèle. Finalement, il est possible de réaliser un modèle comportant des boucles de régulation. C'est le cas du modèle d'Angelidaki et al. (1999) qui prend en compte l'inhibition potentielle de l'acidogénèse, l'acétogénèse et la méthanogénèse.

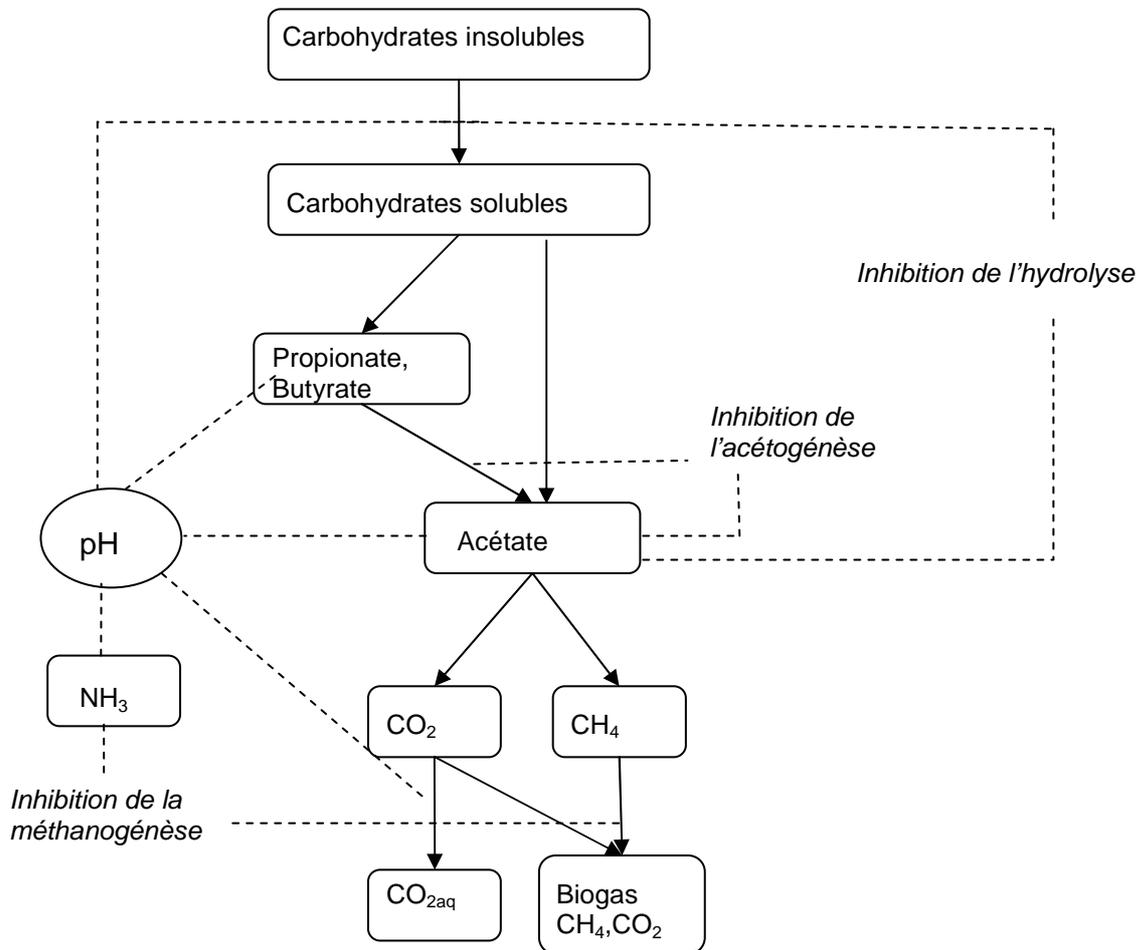


Figure IV.1-2 : Modèle de Angelidaki (Angelidaki et al., 1999)

La Figure IV.1-2 montre quelques boucles de régulation en termes de processus biochimiques. Ces processus sont effectués par des micro-organismes. L'accomplissement de la fonction globale est par conséquent très lié au consortium microbien, qui est l'« effecteur » indispensable de ces processus biochimiques. Par exemple, un choc de pH 6 modifie les espèces bactériennes actives (Delbès et al., 2000). Un choc glucose induit une augmentation transitoire de produits intermédiaires de la digestion anaérobie (Hashsham et al., 2000, Tiedje et al., 2001) et simplifie la communauté archée (Bouallagui et al., 2004).

Cependant, les réactions de ces micro-organismes à des chocs peuvent rester indétectable avec les moyens d'observation actuels. Par exemple, la communauté archée peut ne pas réagir de façon détectable à un choc glucose (Sundh et al., 2003).

**Table IV-1 : Perturbations appliquées sur des bioréacteurs**

Type de perturbation	Type de réacteur	Effet sur le fonctionnement	Référence
Addition de glucose	SBR	Biomasse de bactéries doublée	(Sundh et al., 2003)
Addition de glucose	Réacteurs	Accumulation de produits intermédiaires de la digestion et modification de structure	(Fernandez et al., 2000b, Hashsham et al., 2000)
Choc température	Granules thermophiles	Diminution temporaire du rendement épuratoire	(Lau and Fang, 1997)
Choc température à 55°C pendant 9 heures	Réacteurs mésophiles	Voie du propionate-butyrates inhibée mais rapidement résiliente. Voie de l'acétate moins inhibée mais moins rapidement résiliente	(Visser et al., 1993b)
Choc température à 65°C pendant 9 heures	Réacteurs mésophiles	Modifie les proportions de méthanogènes et de sulfato-réductrices en compétition pour l'acétate	(Visser et al., 1993b)
Addition d'AGV	CSTR	Modification du pH, du rendement de CH <sub>4</sub> et de la production de gaz	(Pind et al., 2003)
pH 8 pendant 8 heures	Réacteurs UASB	Inhibition des méthanogènes au profit des sulfatoréductrices	(Visser et al., 1993a)
Exposition à des acides gras à longue chaîne			(Hwu et al., 1996)
Passage en cycle (jeune puis charge double)	CSTR	Accumulation temporaire d'intermédiaires de la digestion anaérobie, puis adaptation par la structure	(Xing et al., 1997a, Xing et al., 1997b)
Accumulation d'AGV	CSTR	Inhibition des méthanogènes	(Inanc et al., 1999)
Accroissement de la charge	FBR	Débit de gaz globalement plus important mais moins de CH <sub>4</sub> car méthanogénèse inhibée, accumulation de matière organique et d'AGV	(Borja and Banks, 1995)

*AFBGAC, anaerobic fluidized bed granular activated carbon bioreactor; SBR, sequence batch reactor; AGV, Acides Gras Volatils; FBR, Fluidized Bed reactor; UASB, Upward-flow Anaerobic Sludge Blanket; CSTR, Completely stirred tank reactor*

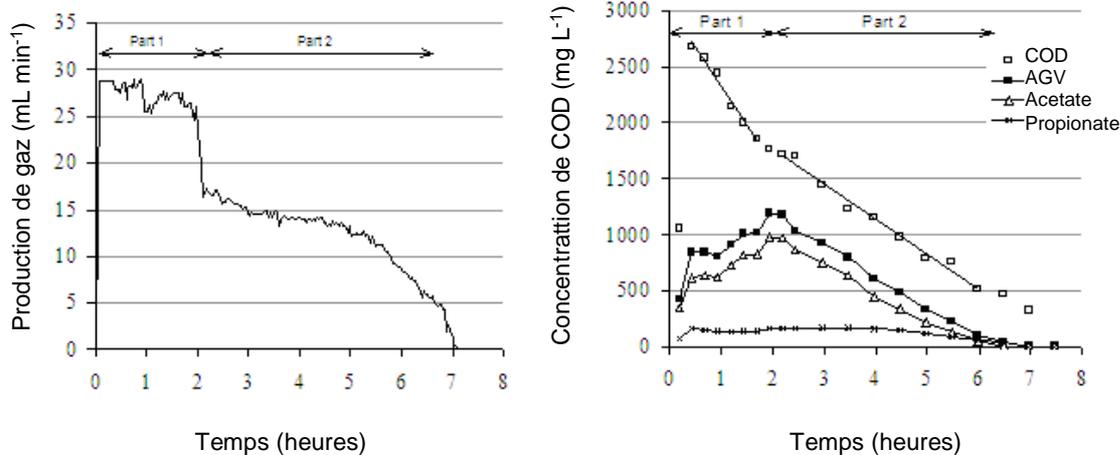
L'un des moyens pour étudier la digestion anaérobie repose sur des chemostats continus. Un débit constant d'alimentation entretient dans ce cas une méthanogénèse continue. Expérimentalement, cette méthode se heurte à des difficultés techniques, surtout en cas de choc pour quantifier la résilience. Trois difficultés majeures des systèmes continus nous ont amenés à construire des chemostats semi-continus (Sequenced Batch Reactor):

- il est difficile de maintenir un débit d'entrée et de sortie stable sur plusieurs mois avec des boues comportant des floccs
- Un débit continu faible impose d'utiliser des tuyaux de faible diamètre, pouvant entraîner un avantage sélectif des gros floccs
- Le système continu ne renseigne pas sur la vitesse de dégradation maximale potentielle

## **IV.2. Contexte expérimental de la digestion anaérobie pour étudier l'effet de petites perturbations**

### **IV.2.1. Les avantages de la digestion anaérobie en chemostat semi-continu**

Les études précédentes menées au laboratoire ont permis de caractériser la digestion anaérobie en chemostat semi-continu. Par exemple, Ruiz et al. (Ruiz et al., 2002) ont montré que la dégradation de la matière organique comporte deux parties mais suit une dynamique d'ordre zéro (Figure IV.2-1).



**Figure IV.2-1 : Production de biogaz et d'acides gras volatils durant la digestion anaérobie de vinasse (Ruiz et al., 2002)**

*La production de gaz après l'ajout de vinasse comporte deux parties distinctes. La dégradation de la matière organique suit une dynamique d'ordre zéro. COD, Chemical Oxygen Demand ; AGV, Acides Gras Volatils.*

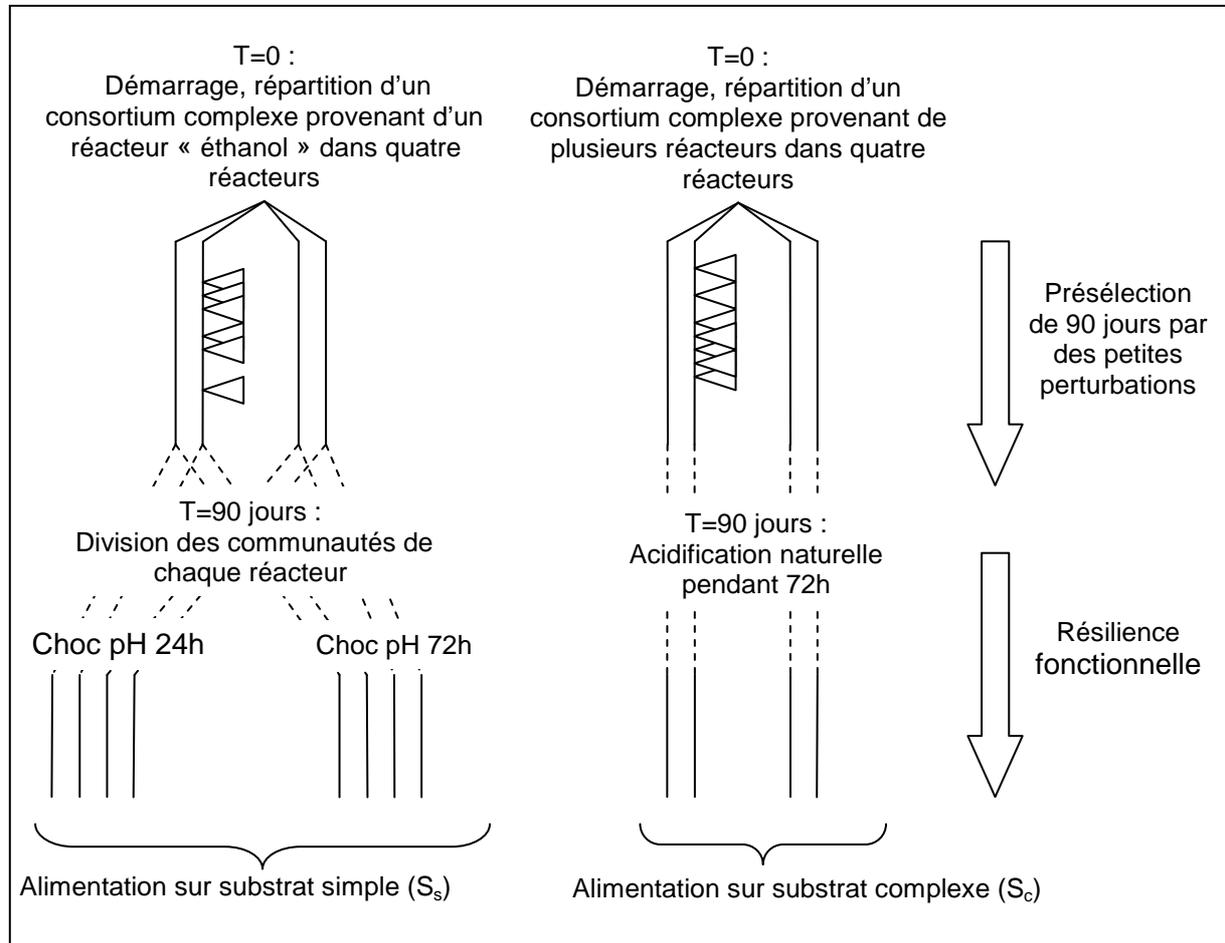
Nous allons nous appuyer sur l'expérience du laboratoire dans la construction et le fonctionnement de ce type de réacteurs pour construire quatre chemostat semi-continus parallèles.

### **IV.2.2. Description de notre dispositif expérimental**

#### *IV.2.2.1. Schéma expérimental*

Le dispositif expérimental a été conçu pour étudier la sélection potentielle par de petites perturbations de caractéristiques de résilience spécifiques. Cette sélection peut a priori se faire en terme de richesse, de structure et/ou de propriétés de croissance. La richesse et la structure sont estimées par SSCP tout au long de l'expérimentation. Nous allons d'abord décrire les chemostats semi-continus ainsi que notre paramètre fonctionnel, puis nous décrivons les petites perturbations effectuées.

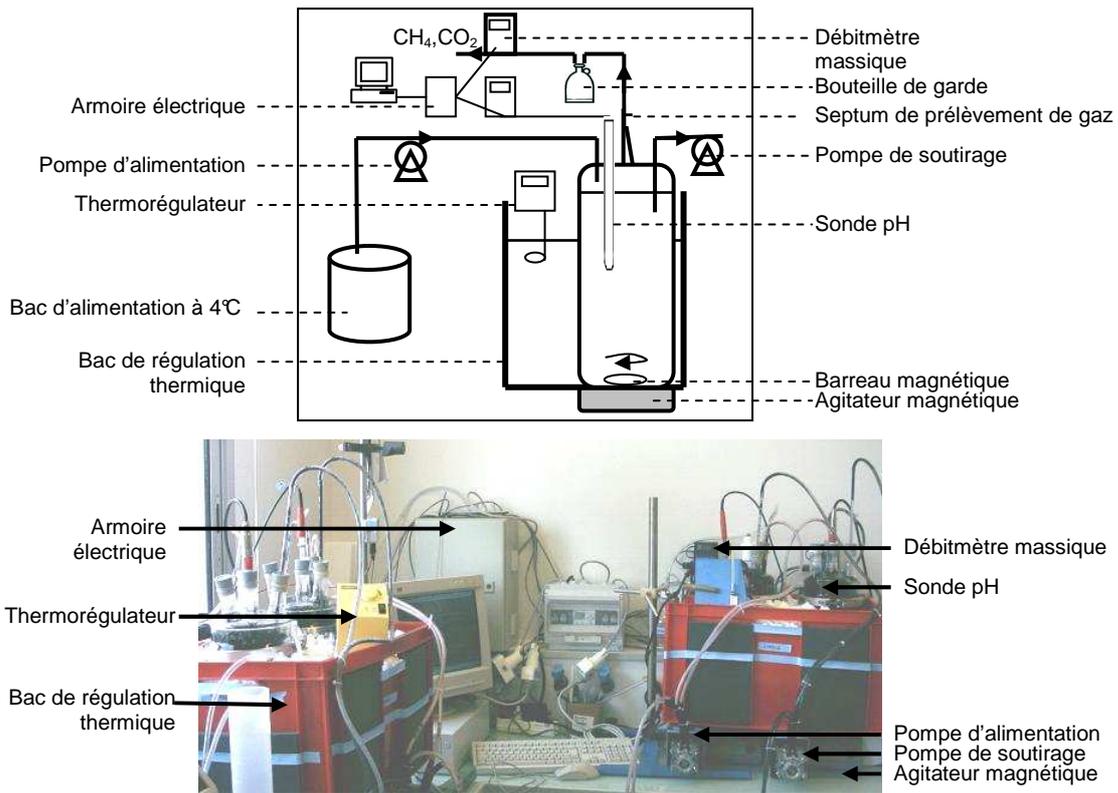
Deux présélections (à partir d'un inoculum) ont été réalisées comme indiqué sur la Figure IV.2-2 La première présélection a été réalisée en alimentant les réacteurs avec un substrat simple ( $S_s$ ), tandis que la deuxième a été réalisée sur substrat complexe ( $S_c$ ).



**Figure IV.2-2 : Schéma expérimental de notre étude de résilience du milieu anaérobie**

Deux inocula ont été répartis dans quatre réacteurs. Deux réacteurs ont été soumis à des variations environnementales à des intervalles et des amplitudes variables. Ces variations peuvent être l'ajout de virus, d'intermédiaires de la digestion anaérobie ou des variations de température. Après 90 jours de sélection, un choc a été appliqué. Trois types de chocs ont été testés : un choc pH court, un choc pH long et un choc pH long causé par une acidification naturelle.

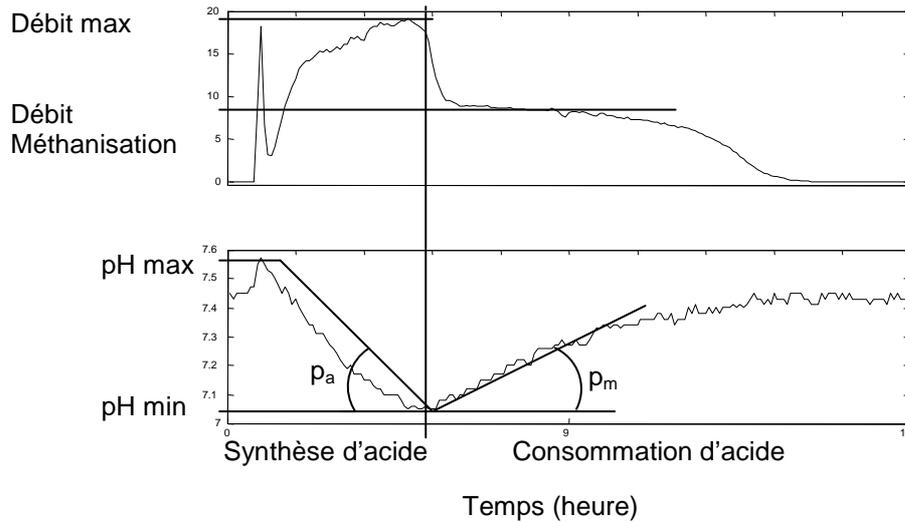
Nous avons divisé un consortium bactérien de digestion anaérobie dans quatre digesteurs de laboratoire de 7 litres. Ces réacteurs sont agités fortement à  $300 \text{ tr min}^{-1}$  par des agitateurs magnétiques. L'alimentation est stockée à  $4^\circ\text{C}$ . Un distributeur soutire 330 mL quotidiennement et fournit le même volume. Deux de ces réacteurs ont subi des perturbations physico-chimiques. Lorsque la flore a été presque totalement renouvelée (i.e. les organismes présents sont adaptés), un choc majeur est appliqué.



**Figure IV.2-3 : schéma d'un digesteur anaérobie et photo du montage expérimental**

Le soutirage est effectué quotidiennement par une première pompe péristaltique. L'addition de substrat maintenu à 4°C se fait également quotidiennement par une deuxième pompe péristaltique dans un digesteur dont la température est contrôlée par un bain-marie. Le pH et le biogaz sont enregistrés en ligne. Le débitmètre massique est protégé par une bouteille de garde. Les quatre digesteurs anaérobies placés dans des bacs de régulation thermique rouges sont alimentés à partir d'un réservoir placé à 4°C.

La dégradation de l'alimentation a pour conséquence de générer du gaz, que nous évacuons grâce à l'agitation du milieu. Le débit de gaz est enregistré en ligne par un débitmètre massique relié à un ordinateur. L'interface entre l'instrumentation et l'ordinateur est assurée par « Modular SPC », un logiciel qui a été développé au laboratoire de biotechnologie de l'environnement. La variation de pH due à la production d'acétate et d'AGV (Acides Gras Volatils) est également enregistrée en temps réel.



**Figure IV.2-4 : Interprétation des données de gaz et de pH acquis en ligne**

Le débit de gaz et le pH sont enregistrés en temps réel (une mesure toutes les 5 minutes). L'addition d'un volume de substrat alcalin engendre une augmentation du pH dans le digesteur. Le volume correspondant de gaz de tête est évacué, ce qui est enregistré par le débitmètre. Puis la digestion anaérobie synthétise plus d'acide qu'elle n'en consomme, ce qui se traduit par une chute de pH et une production de gaz. La méthanogénèse consomme ces acides, ce qui produit du gaz et relève le pH. Le débit maximum dépend des vitesses de l'acidification et de méthanisation.

Le débit maximum est la résultante d'une production maximale de gaz par l'étape d'acidification et par l'étape de méthanisation. Il indique la vitesse de dégradation maximale du système. Par conséquent, le débit maximal est un bon indicateur du fonctionnement global du système.

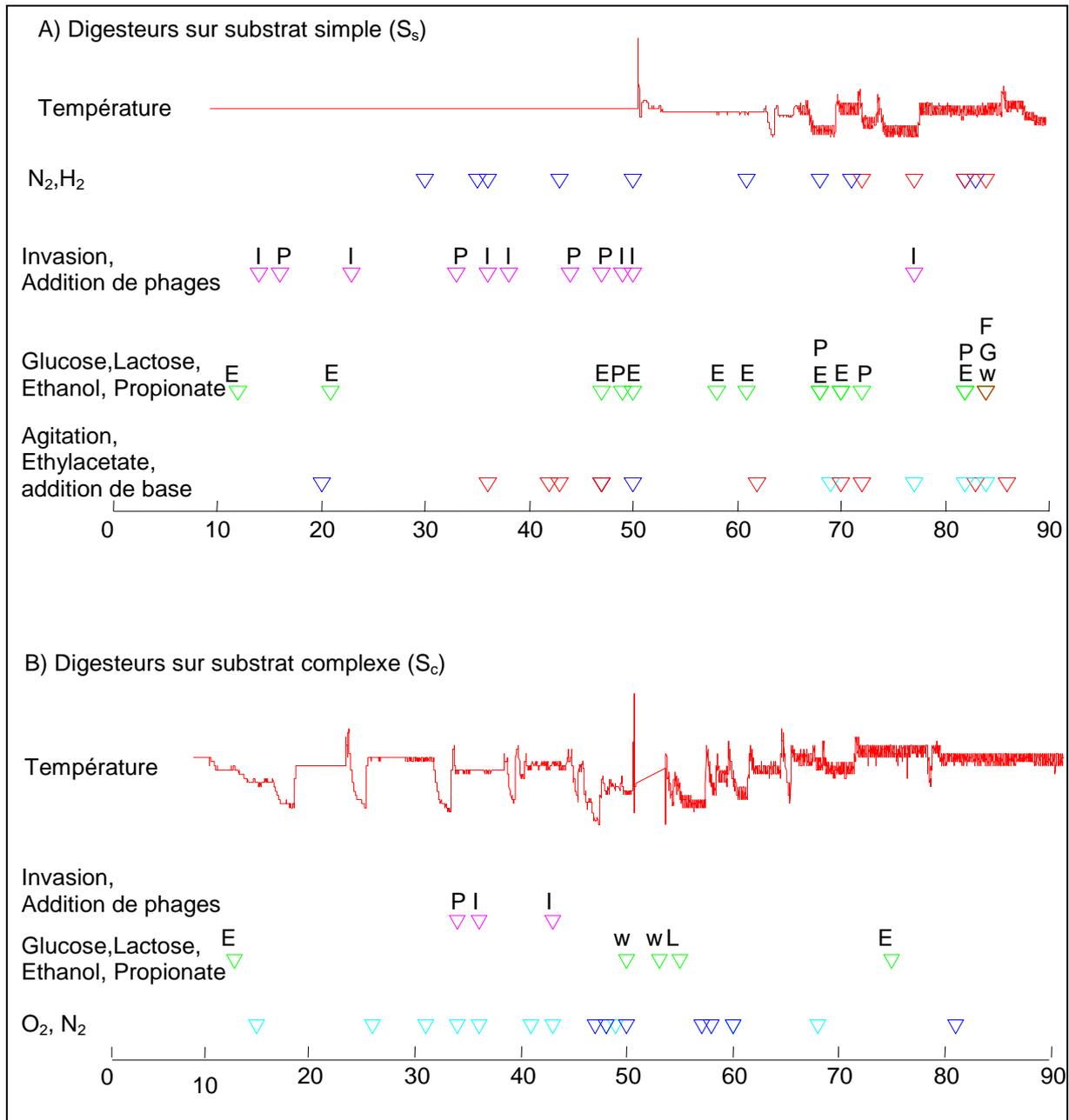
Il est également possible de quantifier le temps total nécessaire à la dégradation d'une certaine quantité de substrat (i.e. durée du cycle).

Les pentes d'acidification ( $p_a$ ) et de méthanisation ( $p_m$ ) peuvent également servir d'indicateur de fonctionnement en supposant que le pouvoir tampon du réacteur est constant au cours du temps.

Nous avons combiné l'observation faite par l'outil moléculaire SSCP et l'indicateur de fonction « débit maximal par unité de biomasse » afin d'étudier la résilience de réacteurs soumis à une histoire « perturbée » et de réacteurs soumis à une histoire « stable ».

#### IV.2.2.2. Description des chocs appliqués

La fréquence et l'amplitude des perturbations qualifiées de « mineures » sont essentielles. Nous avons sélectionné des perturbations qui ont déjà été étudiées sur la digestion anaérobie (Figure IV.2-5).



**Figure IV.2-5 : Représentation schématique des « petites » perturbations appliquées sur deux digesteurs**

Des « petites » perturbations ont été appliquées suivant un ordre aléatoire pendant une période d'environ trois temps de séjours : A, sur des digesteurs alimentés avec un substrat simple ; B, sur des digesteurs alimentés avec un substrat complexe. Ces perturbations peuvent stimuler ou inhiber la digestion anaérobie. Le détail de l'amplitude des perturbations se trouve dans l'article ci-dessous.

**IV.3. Article : Ecological resilience enhanced by perturbations in anaerobic bioreactors**

Zemb, O.<sup>1,2</sup>, Delgenes, J.P.<sup>1</sup>, Lebaron, P.<sup>2</sup>, Godon, J.J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, 11100 Narbonne, France

<sup>2</sup>Université Pierre et Marie Curie-Paris6, Paris, F-75005 France; Institut National des Sciences de l'Univers (INSU) CNRS, UMR7621, BP 44, BANYULS-SUR-MER, F-66650 France

**Running title:** Unstable environment enhances functional resilience

**Keywords:** anaerobic digestion, resilience, SSCP

**Submitted to:** Environmental Microbiology

**Corresponding author:** ZEMB Olivier

Tel: (33) 4 68 42 51 51 (outside France)

FAX: (33) 4 68 42 51 60 (outside France)

Email: zemb.olivier@gmail.com

## Summary

The role of small environmental perturbations as a driving force that increases ecological resilience was explored in anaerobic bioreactors. Aliquots of a community grown on either a simple or complex substrate were exposed to small perturbations over 90 days and then subjected to different major pH shocks. Relative to control conditions, small perturbations drove: (i) the structure of the microbial community and its ecological resilience to a major pH shock when a complex substrate was used, and (ii) only the ecological resilience to a major pH shock for a simple substrate. In both cases, bioreactor's functioning remained similar. However, the populations of duplicate controls and perturbed bioreactors had slightly different behaviors in terms of community evolution and reaction to the major pH shocks. These experiments demonstrated that the prior history of a microbial community drove the system to a more resilient state, and that the systems tested have an internal dynamic which is decoupled from the external dynamic.

## Introduction

The concept of resilience is a topic of central interest in ecosystem studies. Functional ecological resilience is defined here as the magnitude of a disturbance that can modify the ecosystem before it changes its global functioning (Botton et al., 2006). Mineralization of organic matter is a key function for microbial systems in soils (Griffiths et al., 2004), rivers, seawater (Azam, 1983), the human gut (De La Cochetiere et al., 2005), or in the treatment of wastewater (Sundh et al., 2003). Thus, increasing the resilience at the community-level of the microbial networks involved has been the goal of many applied studies targeting the increased reliability of a particular microbial-based process.

Different characteristics of ecosystems have been proposed to affect the resilience of microbial communities, such as: species richness (Girvan et al., 2005, Steiner et al., 2006), productivity (Moore et al., 1993b), substrate utilization capacity (Hashsham et al., 2000), parallel processing of a substrate (Hashsham et al., 2000), a community's structural flexibility (Hashsham et al., 2000), the species composition (Hashsham et al., 2000, Griffiths et al., 2004) and species' tolerance for a major disturbance (Atlas and Bartha, 1993). However, while some factors (for example viruses, (Weinbauer and Rassoulzadegan, 2004) have been studied intensively, few studies have addressed the importance of multiple carbon sources (Pernthaler et al., 2001, Wawrik et al., 2005, Orwin et al., 2006c) or fluctuating environmental conditions (Ives, 1995a, Ives, 1995b, Xing et al., 1997b, Xing et al., 1997a, Gonzalez and Descamps-Julien, 2004, Pett-Ridge and Firestone, 2005, Geets et al., 2006, Lehmann-Ziebarth and R. Ives, 2006).

In this paper, we describe the effects of disturbance and of multiple carbon sources on functional resilience, using the microbial network of methanogenic digestion (i.e. anaerobic conversion of organic materials to methane gas and carbon dioxide gas). Anaerobic digestors are ideal for this type of study because the environment is precisely controlled, non-growing cells are washed out, various functional parameters can be measured, and the structure of the bacterial community is easily characterized. The objectives of this study were to identify the long-term effect(s) of a series of small perturbations on a single community's composition and functioning, and afterwards, to compare the functional resilience of the same network to three different kinds of major shocks.

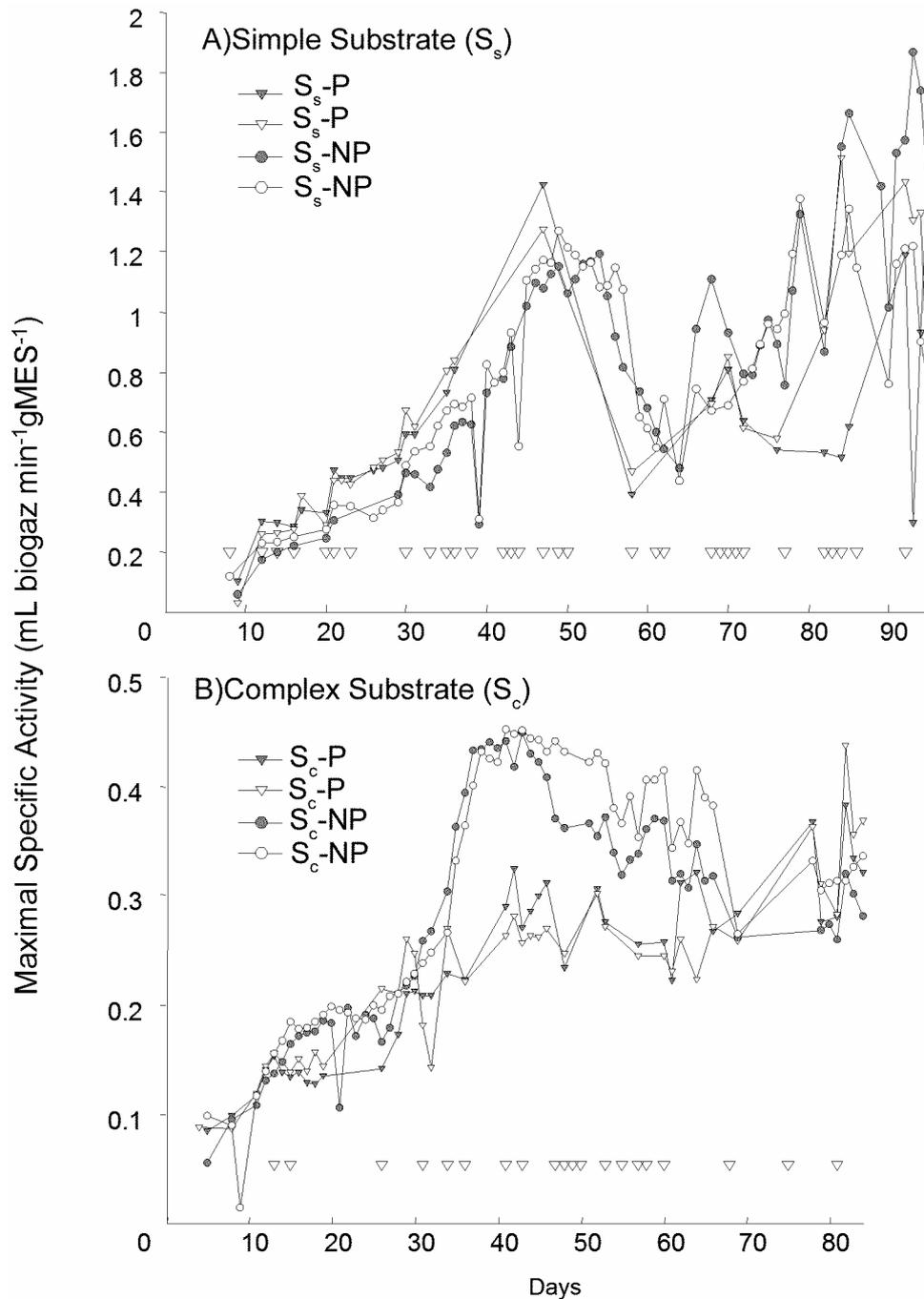
## Results

### *Experiment design*

Two types of experiments were conducted in anaerobic bioreactors inoculated with the same microbial communities and fed with either simple ( $S_s$ ) or complex ( $S_c$ ) substrates. In each experiment, two bioreactors were subjected to minor perturbations (P) during 90 days (pre-selection treatment), while two other bioreactors were operated under non-perturbed (NP) conditions. After 90 days, at least 98% of the microbial biomass was renewed.

At this stage, different pH treatments were applied to the systems. The addition of phosphoric acid to the S-type substrate digesters provoked: (i) a short pH decrease to pH 5.8 during 24 h, or (ii) a longer low pH shock of 24 h at pH 5.8 plus 48 hours at lower pHs. In the bioreactors with the  $S_c$ -type substrate, a pH decrease was produced by an organic overload (see Materials and Methods). The functional results are summarized in the Table 1.

Throughout the experiments, the microbial communities were monitored using single strand conformation polymorphism (SSCP) fingerprints; bacteria and Archaea were analyzed separately (see Materials and Methods). SSCP fingerprint differences are expressed in terms of: (i) numbers of peaks, (ii) background area, which is related to species diversity, and (iii) the average area change per day and principal components analysis (PCA), which both describe the community dynamic. The functioning of the bioreactors was estimated from the maximum conversion rate of the organic matter to methane and carbon dioxide (i.e. maximum specific biogas flow, Figure IV.3-1).



**Figure IV.3-1 : Effect of small perturbations on maximal specific activity of bioreactors**

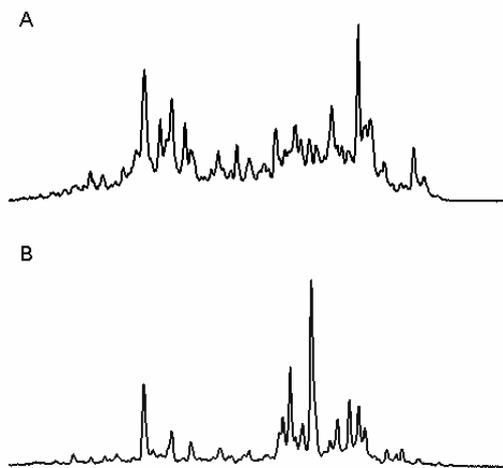
Maximum degradation rate of organic matter as inferred by maximum specific biogas flow in bioreactor experiments. A) Simple substrate experiments, perturbed (triangles) and non perturbed (circles) stabilized at  $1.2 \text{ mL biogas min}^{-1} \text{ gMES}^{-1}$ . B) Complex substrate experiments, perturbed (triangles) and non perturbed (circles) stabilized at  $0.3 \text{ mL biogas min}^{-1} \text{ gMES}^{-1}$ . The open and filled symbols represent the first and the second bioreactors, respectively on each plot. The line of open triangles along the base of each plot indicates the small perturbations applied before the major shocks.

*Consequences of minor perturbations in the simple substrate experiment*

For the perturbed and non-perturbed bioreactors fed with an S-type substrate, the maximum specific biogas flow increased from  $0.3 \pm 0.08$  to  $1.2 \pm 0.37 \text{ mL min}^{-1} \text{ biogas gMES}^{-1}$ . Minor perturbations did

not change the functioning over the long-term and the 4 bioreactors can be considered as functionally identical at the end of the pre-selection period (Figure IV.3-1 A).

The SSCP fingerprints of the bacterial populations in the four  $S_s$  bioreactors on a given day had the same number of peaks (varied between 31 and 43). Their background areas were also similar on a given day and decreased from  $83 \pm 2.5 \%$  in the inoculum, down to  $68 \pm 6.6\%$  at the end of the pre-selection period, indicating decreased diversity. Typical fingerprints from these experiments are illustrated in Figure IV.3-2 A. The existence of a dynamic in the bacterial consortium, even under stable conditions, is illustrated by the rise and decline of peaks on the SSCP fingerprints. At the end of the pre-selection period, this dynamic caused a change of  $0.3 \pm 0.1\%$  of the total area per day between days 70 and 94. In contrast, the Archaeal communities had only 8 peaks, a limited background, and the compositions were stable over the duration of the pre-selection period.



**Figure IV.3-2 : Typical SSCP fingerprints of anaerobic bioreactors**

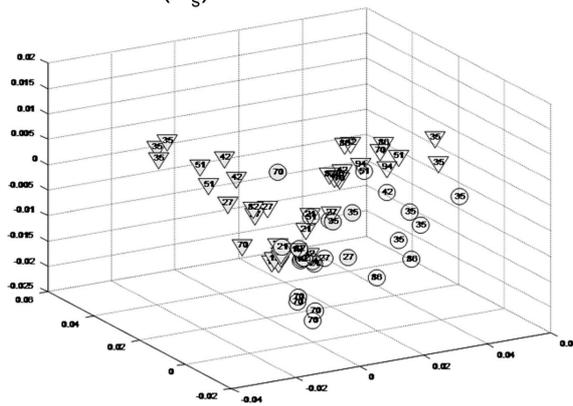
*Bacterial SSCP fingerprint from one of the simple substrate bioreactors,  $S_C$ -P. A) Five days after the inoculation, and B) 82 days after inoculation. Total areas were normalized to 1.*

#### *Consequence of minor perturbations on the complex substrate*

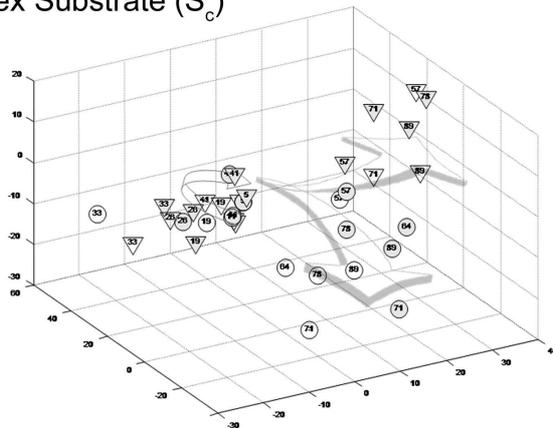
For the 4 bioreactors with the C-type substrate, the maximum specific biogas flow increased from  $0.14 \pm 0.01$  to  $0.3 \pm 0.04 \text{ mL min}^{-1} \text{ biogas gMES}^{-1}$ . Minor perturbations delayed the optimum functioning, which was statistically lower between day 36 and day 63, but at the end of the pre-selection treatment the 4 bioreactors could be considered as functionally identical (Figure IV.3-1 B).

The SSCP fingerprints of the bacterial populations in all 4 of these bioreactors were similar in terms of numbers of peaks (between 23 and 27) and background areas (decreased from  $91 \pm 0.95 \%$  in the inoculum to  $79 \pm 2.3 \%$ ,  $n = 4$ ). Thus, the consortium diversity also decreased in these experiments. Some peaks changed, even under stable operating conditions, which was also the case for the simple substrate. This dynamic affected  $0.3 \pm 0.2 \%$  of the total area per day between days 71 and 89. The Archaeal community on this substrate had only 6 peaks that were stable over the pre-selection period. The evolution of the bacterial consortium under perturbed and non-perturbed operating conditions was described by the principal components analysis for either S-type or C-type feeding experiments (Figure IV.3-3).

A) Simple Substrate ( $S_s$ )



B) Complex Substrate ( $S_c$ )



**Figure IV.3-3 : Principal component Analysis of SSCP fingerprints of bioreactors**

Principal component analysis of SSCP fingerprints from the bioreactors fed either with simple substrate (A) or with complex substrate (B). Symbols are identical to Figure IV.3-1. The number indicates the day when the communities were sampled. No clear trend was observed with the simple substrate. With the complex substrate, the common inoculum (bottom, all marks with small number are grouped), differs between the  $S_c$ -P and the  $S_c$ -NP reactors after 57 days (bottom, circles and triangles are clustered).

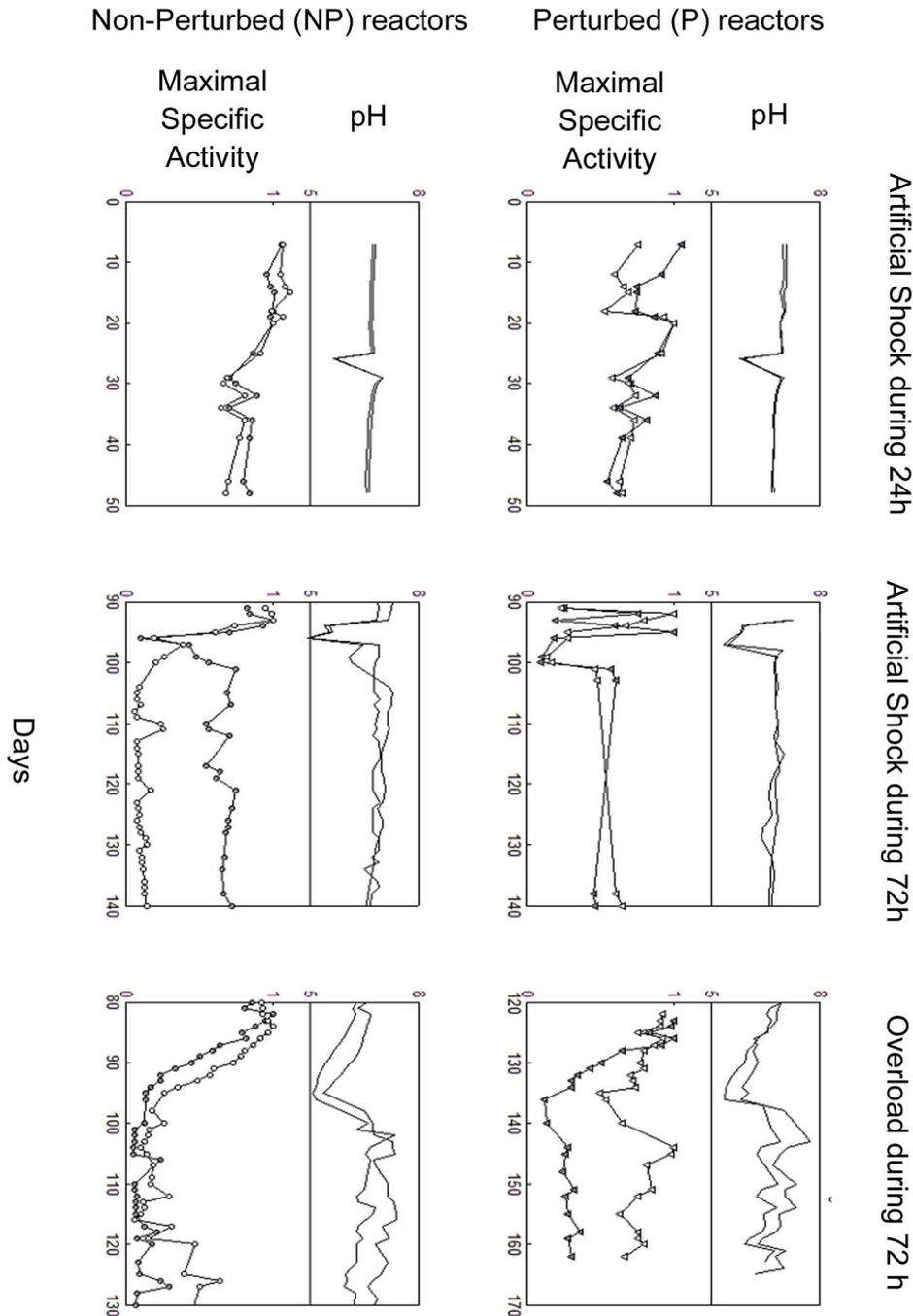
*Consequences of major pH shocks*

The microbial communities' resilience was evaluated after three pH shocks. During the 24 h pH shock, the pH dropped from 7.2, to 5.8 and 5.6 in the  $S_s$ -P and the  $S_s$ -NP bioreactors, respectively, and the lowered pHs were maintained during one alimentation cycle. Methanogenesis continued in the digesters. After 24 h, the pH was raised back to 7.2, and all the bioreactors concerned responded immediately (Figure IV.3-4 A and 4B).

While the pH was kept artificially low for 72 h, methanogenesis continued in  $S_s$ -P bioreactors at pH 5.5, but methanogenesis was inhibited in  $S_s$ -NP bioreactors below pH 5.8. The differences in pH between the  $S_s$ -P (5.4) and  $S_s$ -NP (5.2) bioreactors after the final acid addition step (Figure 4C, 4D), indicate the  $S_s$ -P reactors had a higher buffering capacity. After 72 h, the pH was set back to 7.2. On

Figure IV.3-4C, the  $S_S$ -P reactors were resilient, while only one  $S_S$ -NP system recovered (Figure 4D), indicating that perturbed reactors were more resilient. Both  $S_S$ -P reactors and one of the  $S_S$ -NP reactors were resilient within four and two cycles, respectively.

The pH shock to sludge communities grown on a complex substrate ( $S_C$ -P and  $S_C$ -NP bioreactors), was provoked during 72 h by an organic overload, and consequently an accumulation of fatty volatile acids (FVA) that were not totally eliminated before the next alimentation. The pH in the two  $S_C$ -P bioreactors dropped to 5.8 and 5.4, indicating that reaction to an organic overload varies slightly among replicates. The pH of the non-perturbed bioreactors dropped as low as 5.2. After the pH was returned to 7.2, the two  $S_C$ -NP bioreactors (Figure IV.3-4) and one  $S_C$ -P bioreactor (Figure IV.3-4 F) did not recover. Only one  $S_C$ -P bioreactor almost recovered its previous maximum biogas flow rate, suggesting that perturbed reactors were more resilient. The recovery seen with the biogas flow rates was confirmed by the concentration of intermediate products. Indeed, 17 days after the overload event, the propionate concentration in the resilient  $S_C$ -P reactor was 0.03 g/L compared to the  $0.4 \pm 0.03$  g/L measured just after acidification.



**Figure IV.3-4 : Resilience of anaerobic bioreactors to an acidic shock**

Trends in pH and maximum measured biogas flow in each bioreactor. Top portion of each plot corresponds to measured pH, bottom part to the biogas flow; A) The perturbed bioreactors (open and filled triangles) which were submitted to an artificial pH shock of 24h; B) non-perturbed bioreactors (open and filled circles) submitted to an artificial pH shock of 24h; C) perturbed bioreactors submitted to an artificial pH shock of 72h; D) non-perturbed bioreactors submitted to an artificial pH shock of 72h; E) perturbed bioreactors submitted to a natural pH shock of 72h; F) non-perturbed bioreactors submitted to a natural pH shock of 72h.

*Consequence of major shocks on the microbial community*

During the 72 h acidic shock in the S<sub>S</sub>-P reactors and the S<sub>S</sub>-NP reactors, the Euclidian evolution rate increased significantly after the shock to 1.2 ± 0.6%, showing a shift in the structure of the communities.

During the natural acidification shock in the S<sub>C</sub>-P reactors and the S<sub>C</sub>-NP reactors, the SSCP fingerprint evolved, but the Euclidean distance rate after the shock (0.2 ± 0.04 %) did not differ statistically from the variations observed during the pre-selection period.

**Table IV-2 : Summary of resilient anaerobic bioreactors**

*Resilience of the maximum degradation rate to 80% of its initial value for the perturbed (P) and non-perturbed (NP) bioreactors fed with either a simple substrate (S<sub>S</sub>-P and S<sub>S</sub>-NP) or a complex substrate (S<sub>C</sub>-P and S<sub>C</sub>-NP). Three cases occurred: replicate reactors were both resilient (2/2), only one reactor displayed resilience (1/2) or none were resilient (0/2). Three types of shock were tested: an artificial pH shock of 24h (24 h at pH 5.8) and an artificial pH shock of 72h (24 h at pH 5.8 followed by 48 h at low pH) and a natural shock of 72 h (organic overload that progressively induced acidification over 72 h).*

Type of Carbon source	Simple	Simple	Complex
pH shock	Artificial	Artificial	Overload
Duration of the shock	24h	72h	72h
Nb of resilient P reactors	2	2	1
Nb of resilient NP reactors	2	1	0

**Discussion**

These experiments demonstrate the role of minor environmental perturbations on the resilience of microbial communities. Our results show that the community structure is dynamic and that at least one of the small perturbations acted as a driving force, modifying the structure and increasing the probability of functional resilience developing. The minor perturbations affected the composition of the community, its functioning in the bioreactor and its reaction to a subsequent major shock. However, both the amplitude of the shocks and other driving forces limited our conclusions, and in addition, the composition of the community differed slightly between replicates at the end of the pre-selection period.

*Composition of the microbial communities*

Minor perturbations had detectable long-term effects on the bacterial community composition only when grown on the complex substrate (Figure IV.3-3B). Based on a PCA of all the spectra obtained by SSCP fingerprinting, the communities were not discriminated when the substrate was simple (Figure IV.3-3A). Overall, our results suggest that bacterial communities are more plastic when the substrate is complex, even though all bacterial communities are dynamic. A dynamic bacterial community sustaining a stable function has already been described (Fernandez et al., 1999, Fernandez et al., 2000b, Zumstein et al., 2000, Collins et al., 2006). Interestingly, the PCA grouped

the S<sub>C</sub>-P and S<sub>C</sub>-NP fingerprints separately (day 57, Figure IV.3-3B), shortly after the functioning statistically differed (day 36, Figure IV.3-1B), which suggests that the microbial community succession structure is related to with the system's performance. The species richness (inferred by the background and the peak's abundance) appeared to decrease and stabilize independently from the perturbations. Furthermore, there was no difference in terms of dynamic speed or divergence between perturbed and stable communities in our experiment, as seen in Figure 3.

Similar to previous studies, the archaeal communities' structures were more stable than that of the bacterial communities (Fernandez et al., 1999, Zumstein et al., 2000). The Archaea community was not affected by minor perturbations, probably because the first steps of the anaerobic digestion created a fairly stable niche for this functional group, even under perturbed conditions. The biomass of methanogens has been reported as insensitive to a glucose overload (Sundh et al., 2003), consistent with our observations.

#### *Functioning of the microbial communities*

For a C-type substrate, minor perturbations delayed the optimal efficiency in comparison with the non-perturbed controls, from which we infer a long-term adaptation to perturbation though an adaptation of the structure (Figure IV.3-3). This was shown previously for 2-day and 6-day cyclic variations of influent glucose concentrations (Xing et al., 1997b, Xing et al., 1997a), but is demonstrated here for the first time with small perturbations.

#### *Importance of the complexity of the substrate*

Some substrates can induce a community shift in anaerobic digesters while other cannot (Keyser et al., 2006). Here we found that the compositional change in the bacterial community induced by the minor shocks depended more on the complexity of the substrate than on previous perturbations. There were smaller changes in the communities growing on the complex substrate, yet this substrate provided conditions, which drove the flora with small perturbations in such a way that changes became easily detectable, based on both measurements of functioning and composition. In contrast, a simple carbon source offers fewer catabolic possibilities (Orwin et al., 2006c) and may thus select for relatively fewer microorganisms (Wawrik et al., 2005).

#### *Reaction to a major pH shock*

The amplitude of the shock is a critical parameter. The functional reaction of previously perturbed bioreactors for the 24 h pH shock was similar to the controls. For a major pH shock of 72 h long, perturbed bioreactors could function over a broader range of environmental conditions, because the S<sub>S</sub>-P communities were still able to perform methanogenesis at pH 5.5, while they were inhibited at the same pH in S<sub>S</sub>-NP bioreactors. Therefore, the perturbed communities were more tolerant to environmental fluctuations independently of the buffering. Furthermore, the buffering capacity of the perturbed reactor was slightly higher. For these two reasons, perturbed reactors are more likely than stable reactors to return to their original function after a pH shock ( Figure IV.3-4). Additionally, there was a difference between the observed resiliences after an artificial or a natural pH shock. Resilience of degradation rates have been reported to depend on the extent and duration of the pH shock, as well as on the concentration of fatty volatile acids during the event

(Leitao et al., 2006b). This might explain differences we observed between an artificial pH shock and acidification.

A higher species richness enhances resilience (Girvan et al., 2005), but no difference between perturbed and stable reactors in terms of species richness were measurable in our studies, neither based on the number of peaks nor the background area (Loisel et al., 2006). The accumulation of intermediate products did not reveal a major difference in the processing pathways (Hashsham et al., 2000). Therefore, we suggest that the perturbation selected a few key species (Griffiths et al., 2004) rather than a parallel processing by multiple species.

#### *Different functional responses in replicates*

Duplicate bioreactors may have slightly different microbial populations after 90 days and react differently to a major shock. Furthermore, microbial communities can be dynamic even in stable conditions (Fernandez et al., 2000b, Kaewpipat and Grady, 2002). We assume that stochastic processes, such as internal viral lysis interact such that environmental conditions are not the only driving forces engaged. Slight differences in this independent process may have consequences on the long term changes in the community.

In conclusion, minor perturbations do select specific communities, but they are not the only driving forces. Specific activity and SSCP fingerprints can be changed by a minor perturbation, but do not always indicate differences in resilience. Indeed, the reaction to a shock depended on prior events without detectable effects using these indicators, so that testing shocks sequentially can have unrecognized implications. In a more general way, this study provides experimental evidence that historical conditions do influence the response of an ecosystem to shock(s). Nonetheless, an ecosystem's response also depends on other factors which will be addressed in future investigations.

## **Experimental Procedures**

### *Bioreactor conditions*

The experimental set-up consisted of four continuously mixed 7 L (working volume) all-glass bioreactors, inoculated with a single microbial community. Two reactors were used to pre-select microbial communities under perturbed conditions (P) and the two others were used as controls without any external perturbations (non-perturbed, NP).

Two pre-selections were done. The first procedure effected a pre-selection through minor perturbations created by daily alimentation of a simple substrate ( $S_s$ ) composed of ethanol (2.5 %), nitrogen, NaOH (0.15 %) and 5 ppm of metallic trace element solution (B 0.8, Ba 1.61, Co, 1.75, Ni 6.5, Fe, 9.925, Al 11.25, Mn 12.71, Zn 14.8, Sr 18.33, Cu 20.21 g L<sup>-1</sup>) which corresponded to 13.44 g COD. For this first pre-selection, the seed sludge was fluid from a methanogenic reactor fed with ethanol and having a hydraulic retention time of 22 days.

The second pre-selection procedure used minor perturbations from alimenting the bioreactors with a mixture of milk and wine ( $S_c$ ), each contributing 6.3 g of the total 12.6 g of influent COD. For this second pre-selection, the four reactors were inoculated with a mixture of two volumes anaerobic sludge (obtained from a wastewater plant) with one volume of sludge from a pilot scale digester, all fed with distillery slops and using a hydraulic retention time (HRT) of 25 days.

### *Bioreactor monitoring*

Reactor performances were monitored in-line (every 5 min) for pH and total gas production. Gas composition (methane and carbon dioxide) and volatile fatty acid (VFA) concentrations were determined by gas chromatography (Shimadzu CR3A) using a capillary column (FFAP), a flame ionization detector and ethyl-2-butyric acid as an internal standard (Garcia-Calderon et al., 1998). Suspended solids analyses were carried out according to standard methods (Association, 1992).

### *Minor perturbations*

Two additional pre-selection treatments by minor perturbations were done. Perturbations to one set of two bioreactors were done based on previously published descriptions (for review, see (Leitao et al., 2006a)) such that the functioning of the bioreactors was not dramatically altered. Typically, a HRT of 20 days long allowed a wide range of disturbance frequencies and amplitudes to be applied, as anaerobic systems might be sensitive to environmental changes due to inherent slow growth rate (Xing et al., 1997b). For example, various enhancers such as formic acid, sucrose, glucose maltose or lactic acid and inhibitors such as ethyl acetate or acetone were added punctually. An electricity failure on day 39 of the  $S_c$ -experiment caused a temperature decrease in the stable reactor. The perturbed reactors were then starved to compensate for the extra nutrients present.

In the  $S_s$ -experiment, agitation was stopped during the days 36, 47 and 62. The other disturbances in the  $S_s$ -experiment were 2, 4, 8, 4, 8, 8, 3, 5, and 10 mL of ethanol (Prolabo) added on the days 12, 21, 47, 50, 58, 61, 68, 70 and 82 respectively; 6, 2, 2, 3, 6 and 3 mL ethylacetate added on the days 42, 43, 47, 70, 72 and 86 respectively; 7 g of D-glucose (Carlo Erba) were added on the days 40 and 47; gaseous hydrogen was applied for 2 minutes on the days 72, 77, 82 and 84. 1 g of lactose was added on the day 8. Gaseous nitrogen was applied during 10, 10, 3, 3, 10, 3, 2, 3, 3 minutes on the days 30, 35, 36, 43, 50, 61, 68, 82, 83. The anaerobic reactors were opened during 10, 5, 25 and 7 minutes on the days 69, 77, 82 and 84 in order to apply small oxygen shocks. One mL of acetone was added on day 83. Ten, 100, 5, 10, 250, 10 and 90 mL of sludge from other reactors were added on the days 14, 23, 36, 38, 49, 50 and 77. Six mL of formic acid (Prolabo) was applied on day 84. Propionic acid was added on days 49, 68, 70, 72, 82 and 92. 8 mL of wine was added on day 84. The mean temperature was 32 °C (range was 18 °C to 44 °C).

In the  $S_c$ -experiment, 10, 5 and 3 mL ethanol were added on the days 13, 75 and 97. 14, 7 and 7 g of D-glucose were added on the days 28, 34 and 60. 14 g Lactose were added on day 55. Gaseous nitrogen was applied during 2 minutes on day 50. The anaerobic reactors were opened during 30, 30, 1, 10, 30, 60, 60, 10, 900, 5 and 10 minutes on days 15, 26, 31, 34, 36, 41, 43, 48, 49, 60 and 68 to apply an oxygen shock. Ten mL of supernatant from another reactor were added on day 34. Thirty and 10 mL of sludge from another reactor were added on days 36 and 43. Ten mL of wine were added on days 50 and 53. The minimal temperature was 25 °C, the maximal temperature was 42 °C and the mean temperature was 33 °C.

### *Major shocks*

The communities resulting from the pre-selection treatments on the simple substrate were divided in two parts. The first part was used to test a 24 h pH shock (addition of 13 mL of phosphoric acid causing the pH to drop to 5.8, and after 24 h, the pH was set back to 7.2 with NaOH). The second part was used to test a longer, 72 h step-wise pH shock. To achieve this, 13 mL of phosphoric acid were added to the bioreactors, causing an initial sharp pH drop to 5.9 in S<sub>s</sub>-P and to 5.6 in S<sub>s</sub>-NP, respectively. After 24 h, 4 mL more of acid were added (pH drop to 5.8 in S<sub>s</sub>-P and to 5.3 in S<sub>s</sub>-P) and at 48 h an additional 3 mL of acid were to each bioreactor. This addition caused the final pH decrease to 5.4 in S<sub>s</sub>-P and to 5.2 in S<sub>s</sub>-NP, respectively. The pH was returned to 7.2 in the bioreactors with an addition of NaOH after 72 h.

The communities resulting from the second pre-selection treatments on the complex substrate (S<sub>c</sub>) were used to test the effect of a 72h natural acidification, provoked by an organic overload in the bioreactors. As above, the pH was set back to 7.2 with NaOH after 72 h.

#### *Sampling and extraction of total genomic DNA*

Ten milliliter samples were collected twice weekly in 14 mL sterile tubes from the middle of each bioreactor, from day 1 to day 125. The samples were centrifuged at 6000g (10 min, 4 °C). Pellets were resuspended in 2 mL of 4 M guanidine thiocyanate Tris-HCl 0.1 M at pH 7.5 and 600 µL of 10% N-lauroyl sarcosine. Aliquots of 500 µL were placed into 2 mL screw-cap microcentrifuge tubes, and stored at -20 °C before DNA extraction. The extraction and purification of total genomic DNA were performed with the Qiagen DNA stool kit following the manufacturer instructions.

#### *Monitoring bacterial community structure with SSCP analysis*

For SSCP analysis, a short fragment (200 bp) of the V3 region of the 16S rDNA gene was PCR amplified using the universal bacterial primers W49 (ACGGTCCAGACTCCTACGGG) and 6-FAM labelled W104 (TTACCGCGGCTGCTGGCAC) (Eurogentec, Belgium), and Pfu Turbo DNA polymerase (Stratagene, Holland) as described by Chachkhiani et al. (2004). PCR reactions contained 0.4 µM primers, 0.2 mM dNTPs and 2.5 U Pfu. Cycling conditions were 2 min at 94 °C followed by 25 cycles of a three-stage program with 30 s at 94 °C, 30 s at 61 °C, 30 s at 72 °C, and a final elongation for 10 min at 72 °C. Amplification product sizes were confirmed by agarose gel electrophoresis. PCR products were then diluted 10 to 600-fold, and 1 µL of the dilution was denatured in 19 µL formamide together with the internal standard ROX 400HD (ABI) during 10 minutes at 94 °C. After a reformation step of 10 minutes at 4 °C, the sample was then analysed under non-denaturing conditions by SSCP capillary electrophoresis with an ABI 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems) using the protocol described by Delbes et al. (2000).

#### *Analysis of SSCP fingerprint data*

Analyses were done with SAFUM, a software developed with Matlab™ especially for SSCP analysis. Using this software, the total areas of each fingerprint were normalized to one and the areas under the peaks were estimated using a rolling ball algorithm. The principal components analysis was done using each normalized profile as an individual.

*Statistics*

For each day, the four reactors were characterized by a specific activity. A t-test was used to evaluate if the differences in specific activity were statistically significant.

*Acknowledgements*

We thank Valérie Bru and Jerome Hamelin for helpful discussion and Jennifer Guarini for scientific advice and careful reading of the manuscript.

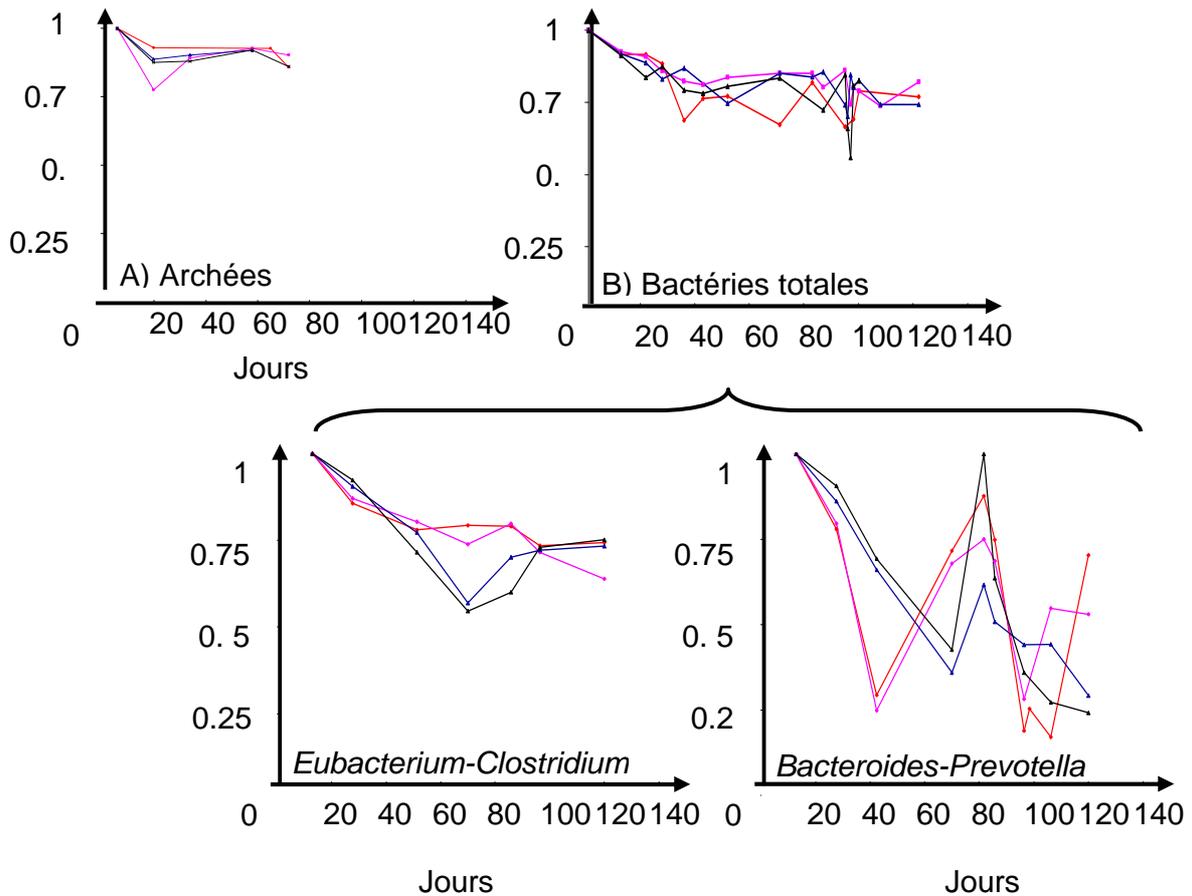
## **IV.4. Résultats complémentaires et discussion**

### **IV.4.1. Des systèmes dynamiques avant le choc acide**

Divers auteurs ont tenté d'assigner un groupe phylogénétique à chacune des étapes de la Figure IV.1-1, mais ces tentatives n'ont pas été couronnées de succès. Cela n'est pas surprenant car plusieurs études montrent que le consortium bactérien et archéen ne cessent d'évoluer même en fonctionnement stable (Fernandez et al., 1999, Fernandez et al., 2000b) : Le contexte microbien de la digestion anaérobie peut donc être dynamique et réaliser une digestion globale constante. Dès lors, il semble utopique d'associer cette digestion constante à l'accomplissement constant de chaque étape par un nombre fixe d'individus spécialisés.

Parmi les groupes microbiens qui participent aux premières étapes de la digestion anaérobie, il est possible d'étudier finement les *Eubactérium-Clostridium* et les *Bacteroides-Prevotella* (voir Annexe 7 : Amorces utilisées pour la SSCP). Ces deux groupes microbiens font partie du consortium bactérien et participent en tant que tel à l'empreinte moléculaire « bactéries totales ». Lorsque ces groupes représentent une fraction importante du consortium, l'empreinte moléculaire totale est clairement une combinaison de l'empreinte *Eubactérium-Clostridium* et de l'empreinte *Bacteroides-Prevotella* (Peu et al., 2006). La diversité de ces groupes empêche de leur associer une fonction précise au sein de la digestion anaérobie.

Il existe cependant un cas où la phylogénie a pu être reliée à la fonction : L'étape de méthanogénèse semble concerner uniquement les archées. C'est la raison pour laquelle il est intéressant de séparer les archées du reste de la communauté microbienne. De façon intéressante, la structure bactérienne, qui est associée aux deux premières étapes varie plus rapidement que la structure des archées, associée à la méthanogénèse (Figure IV.4-1). Cela a déjà été observé dans les réacteurs anaérobies par Zumstein et ses collaborateurs (Zumstein et al., 2000). Cette observation suggère que la niche des archées est relativement étroite et stable, bien que des shifts majeurs soient observés de temps en temps (Fernandez et al., 1999).



**Figure IV.4-1 : Evolution des profils SSCP par rapport au profil initial**

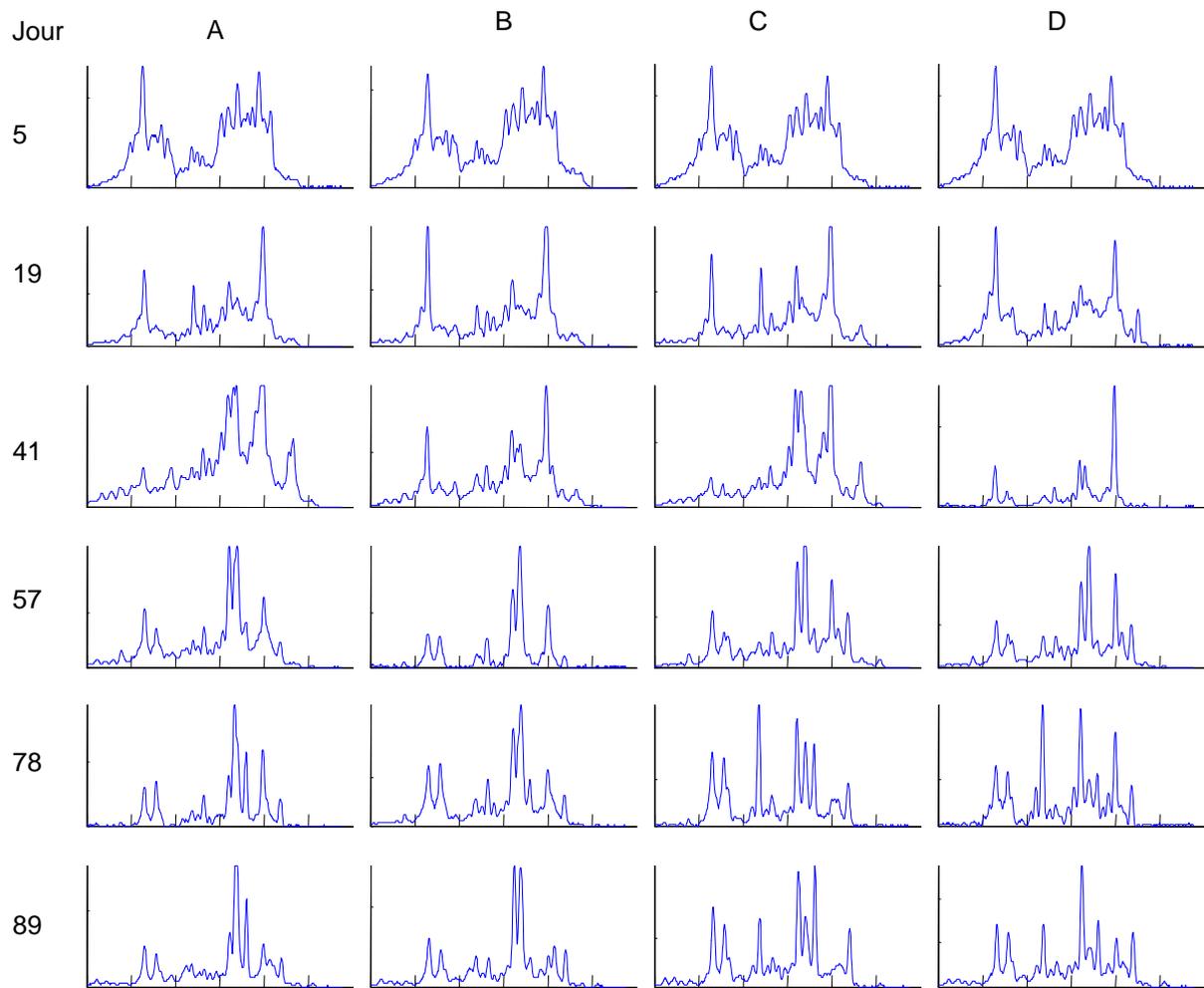
La distance euclidienne entre le profil SSCP du jour  $N$  et le profil SSCP de l'inoculum pour les réacteurs alimentés avec un substrat complexe ( $S_c$ ). Les courbes de couleur chaude représentent les réacteurs  $S_c$ -P, les courbes de couleurs froides représentent les réacteurs  $S_c$ -NP. A, évolution des archées ; B, évolution des bactéries totales qui comprend l'évolution du groupe Eubactérium-Clostridium et l'évolution du groupe Bacteroides-Prevotella.

La dynamique de compartiment bactérien suggère qu'il n'existe pas de situation stable de type « climax » de la digestion anaérobie : il n'y aurait pas de consortium idéal de bactéries tel que chaque population se maintienne à une abondance relative stable grâce à la dégradation d'un intermédiaire spécifique. Il y a probablement une part aléatoire dans la sélection naturelle. C'est l'hypothèse la plus simple pour ces systèmes qui évoluent continuellement et qui divergent au cours du temps.

#### **IV.4.2. Des systèmes « divergents » avant le choc acide**

Deux réacteurs macroscopiquement identiques inoculés avec le même consortium initial peuvent engendrer des dynamiques bactériennes légèrement différentes. On parle dans ce cas de « divergence ». Nous allons voir que la communauté bactérienne évolue vers des états légèrement différents, ce que l'on peut retrouver dans des groupes bactériens comme les Eubactérium-Clostridium ou les Bacteroides-Prevotella.

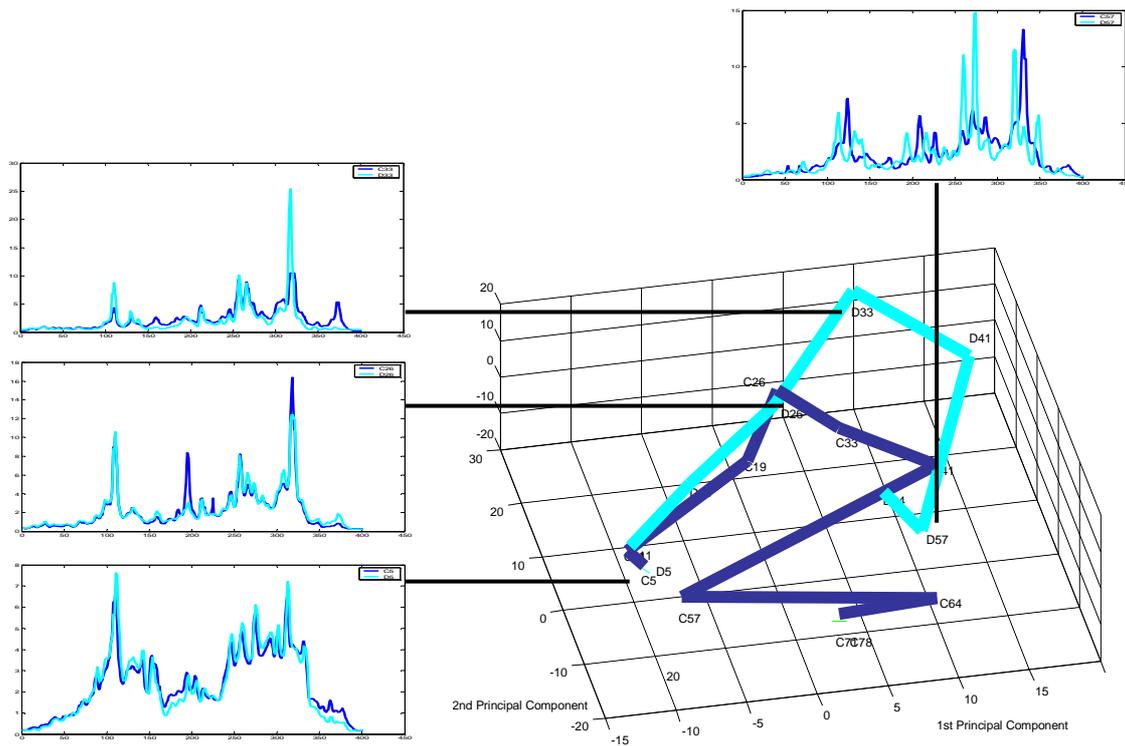
IV.4.2.1. Divergence de la communauté bactérienne anaérobie



**Figure IV.4-2 : Divergence structurelle de la communauté bactérienne entre les réacteurs  $S_c$**

Colonne A, profils SSCP de la communauté bactérienne totale du premier réacteur  $S_c$ -P ; Colonne B, profils SSCP de la communauté bactérienne totale du deuxième réacteur  $S_c$ -P ; Colonne C, profils SSCP du premier réacteur  $S_c$ -NP de la communauté bactérienne totale ; Colonne D, profils SSCP de la communauté bactérienne totale du deuxième réacteur  $S_c$ -NP ; Les nombres à gauche indiquent le nombre de jours après l'inoculation d'un consortium initial commun. L'analyse en composante principale de ces données est représentée page 148.

Dans deux bioréacteurs (C et D, Figure IV.4-2) inoculés avec le même consortium complexe au jour 0, les communautés évoluent au cours de l'incubation vers deux structures proches mais distinctes (jour 89). Ces différences peuvent être représentées en utilisant une analyse en composante principale sur les échantillons de ces deux bioréacteurs



**Figure IV.4-3 : ACP des spectres SSCP de bioréacteurs « stables »**

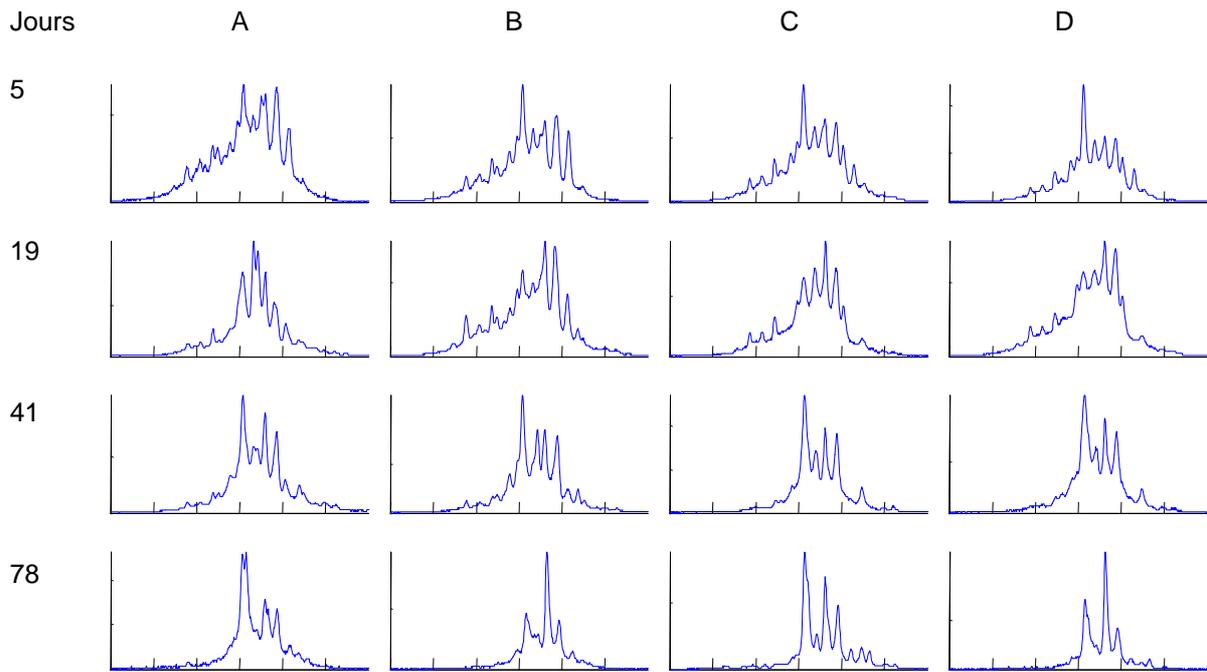
Analyse en composante principale des échantillons SSCP des bioréacteurs anaérobies sur substrat complexe ( $S_c$ -NP) ; Les spectres des jours 5, 26, 33 et 57 sont représentés dans les inserts. L'ACP comprenant tous les échantillons est représentée page 148.

En conclusion, il est difficile de déterminer la cause de la dynamique interne, mais il semble que celle-ci ne soit pas entièrement déterministe, puisqu'après 89 jours de fonctionnement, un même inoculum a engendré des communautés légèrement différentes. Cette conclusion est renforcée par l'observation détaillée de deux groupes bactériens.

#### IV.4.2.2. Divergence du groupe *Eubacterium-Clostridium*

Les bactéries participant aux premières étapes de la digestion anaérobie (i.e. hydrolyse et acidogénèse) ont un métabolisme de type anaérobie strict ou facultatif (Archer and Kirsop, 1990), Elles forment un ensemble phylogénétique hétérogène regroupant de nombreux groupes bactériens (Colberg, 1988 , McInerney, 1988), dont le groupe *Eubactérium-Clostridium*.

Le groupe *Eubactérium-Clostridium* est parfois considéré comme un groupe résistant aux perturbations environnementales (Peu et al., 2006). La structure de ce groupe évolue dans le temps, comme illustré sur la Figure IV.4-4.



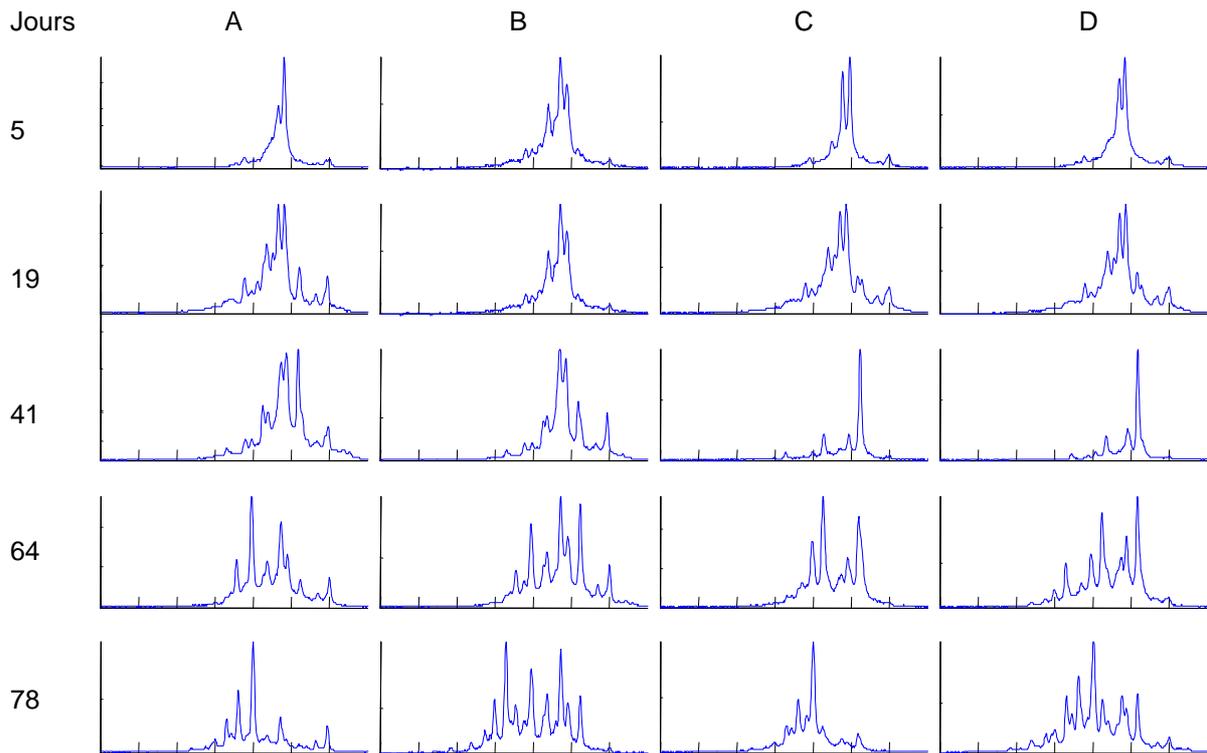
**Figure IV.4-4 : Divergence structurelle de la communauté *Eubacterium-Clostridium***

Colonne A, profils SSCP de la communauté bactérienne totale du premier réacteur  $S_c$ -P (temps de rétention en abscisse, intensité de fluorescence en ordonnée); Colonne B, profils SSCP de la communauté bactérienne totale du deuxième réacteur  $S_c$ -P; Colonne C, profils SSCP du premier réacteur  $S_c$ -NP de la communauté bactérienne totale; Colonne D, profils SSCP de la communauté bactérienne totale du deuxième réacteur  $S_c$ -NP; Les nombres à gauche indiquent le nombre de jours après l'inoculation d'un consortium initial commun. L'aire totale des profils a été normalisée.

En conclusion, la divergence observée pour la communauté totale se retrouve également au niveau du groupe *Eubacterium-Clostridium*, quoique plus faiblement.

#### IV.4.2.3. Divergence du groupe *Bacteroides-Prevotella*

Le groupe *Bacteroides-Prevotella* participe aux premières étapes de la digestion anaérobie. Il est possible d'étudier ce groupe, qui est une partie de la communauté totale, en effectuant une PCR avec des amorces spécifiques (cf. annexe 4). La Figure IV.4-5 illustre l'évolution et la divergence structurelles de ce groupe.



**Figure IV.4-5 : Divergence structurelle de la communauté *Bacteroides-Prevotella***

En conclusion, le groupe *Bacteroides-Prevotella* présente une évolution plus rapide et une divergence plus grande que le groupe *Eubacterium-Clostridium*. Il est difficile de déterminer si l'évolution plus rapide est la cause de la divergence plus grande sur un intervalle de temps fixe. A la fin de la période de 90 jours de présélection, nous avons par conséquent des communautés microbiennes de structure différente sur lesquelles nous allons appliquer des chocs acides pour mesurer la résilience fonctionnelle. Ces chocs sont décrits dans le paragraphe suivant.

#### **IV.4.3. Détail des chocs acides**

Trois chocs ont été expérimentés sur des consortia sélectionnés par de petites perturbations. Les deux premiers chocs acides artificiels (Figure IV.4-6 et Figure IV.4-7) ont été testés sur des réacteurs alimentés avec un substrat simple [principalement de l'éthanol], le troisième choc acide a été provoqué par une acidification naturelle du digesteur (Figure IV.4-8). De ces enregistrements bruts, le débit maximal de biogaz journalier a été extrait et rapporté aux matières en suspension (Figure IV.3-4).

Dans le cas des chocs artificiels, le pH chute brutalement. L'addition de protons  $H^+$  modifie l'équilibre  $CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow HCO_3^- + H^+ \leftrightarrow CO_3^{2-} + 2H^+$ , ce qui a pour conséquence un dégagement de  $CO_2$  très important (jusqu'à 73% dans le cas de choc acide de 24h et jusqu'à 88% dans le cas du choc acide de 72h).

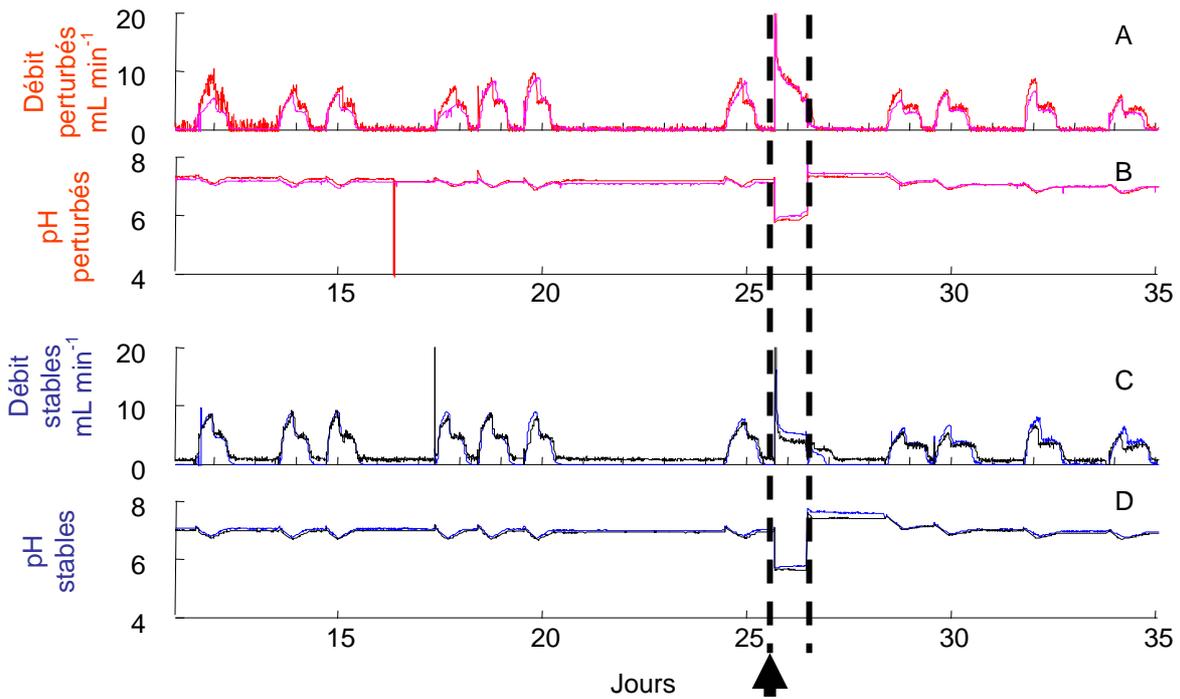


Figure IV.4-6 : Choc acide artificiel de 24h sur les réacteurs  $S_s$ -P et  $S_s$ -NP

A, Enregistrement brut de gaz produit au cours du temps pour les deux réacteurs perturbés alimentés sur substrat simple ( $S_s$ -P) ; B, enregistrement brut du pH dans les réacteurs  $S_s$ -P ; C, Enregistrement brut de gaz produit au cours du temps pour les deux réacteurs non-perturbés alimentés sur substrat simple ( $S_s$ -NP), D, enregistrement brut du pH dans les réacteurs  $S_s$ -NP

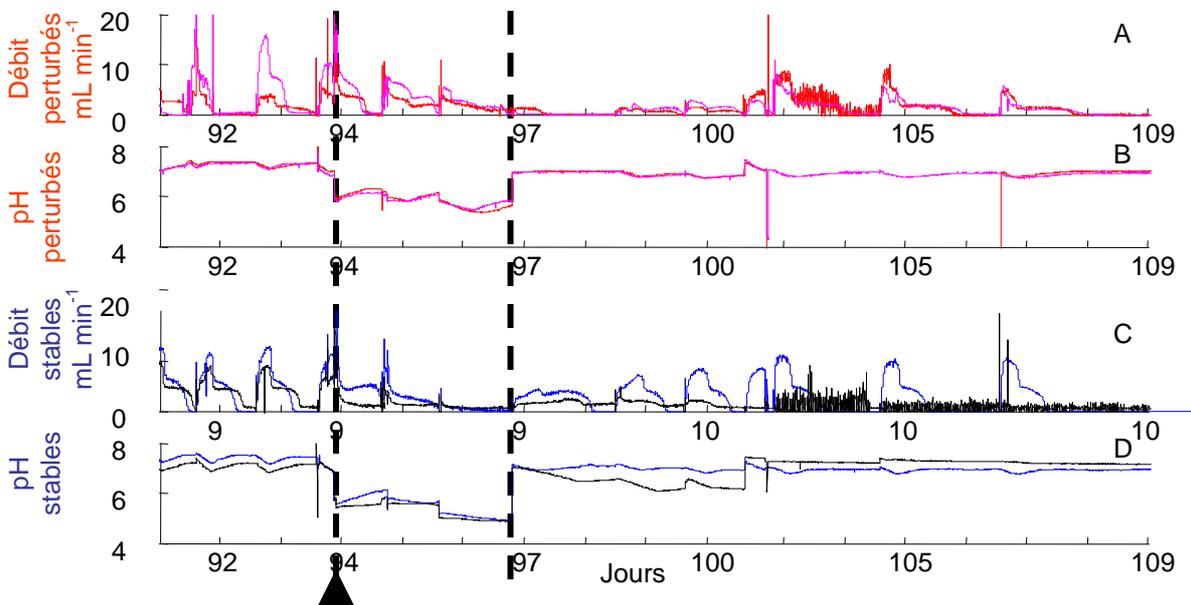


Figure IV.4-7 : Choc acide artificiel de 72h sur les réacteurs  $S_s$ -P et  $S_s$ -NP

A, B, C et D – Voir légende graphique précédent.

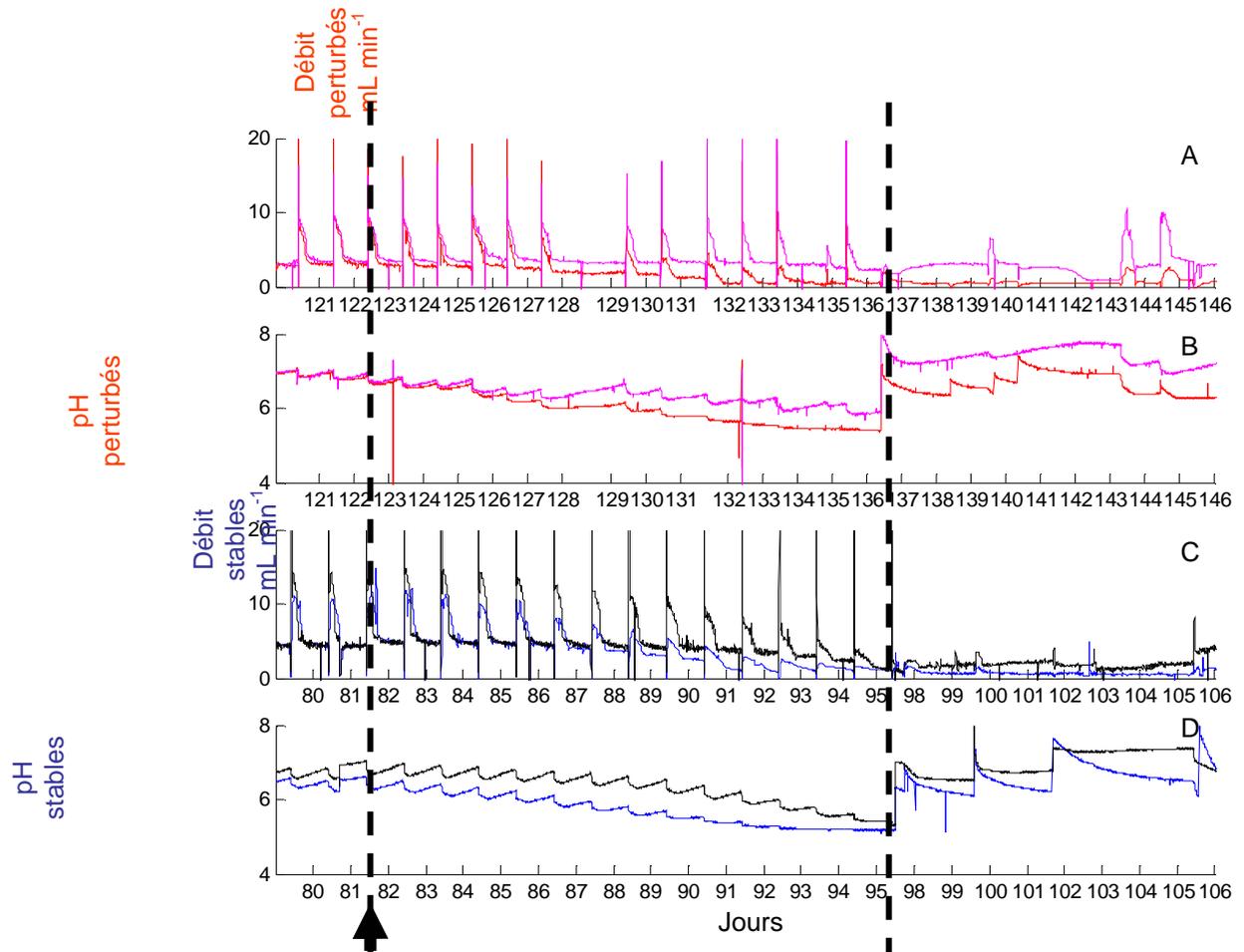


Figure IV.4-8 : Détail de la catastrophe « naturelle » sur les réacteurs S<sub>c</sub>-P et S<sub>c</sub>-NP

A, Enregistrement brut de gaz produit au cours du temps pour les deux réacteurs perturbés alimentés sur substrat simple (S<sub>c</sub>-P) ; B, enregistrement brut du pH dans les réacteurs S<sub>c</sub>-P ; C, Enregistrement brut de gaz produit au cours du temps pour les deux réacteurs non-perturbés alimentés sur substrat simple (S<sub>c</sub>-NP), D, enregistrement brut du pH dans les réacteurs S<sub>c</sub>-NP

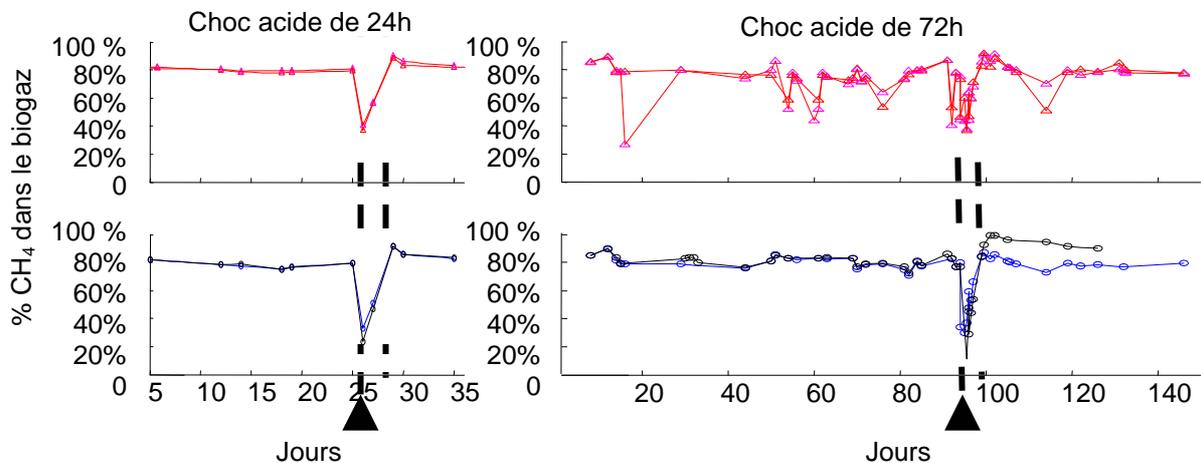


Figure IV.4-9 : Variation du gaz dans l'espace de tête lors d'un choc pH

Le pourcentage de méthane (normalisé de telle sorte que  $\%CH_4 + \%CO_2 = 1$ ) en fonction du temps

#### **IV.4.4. Floccs, biofilm et cellules libres pendant le choc**

Le consortium de digestion anaérobie n'est pas simplement un ensemble de cellules libres qui coopèrent : tous les procédés industriels utilisent des biofilms fixés ou des floccs (que nous considérons comme du biofilm non fixé). Il a été montré que ces biofilms pouvaient générer une organisation spatiale qui génère des gradients d'oxygène et/ou de nutriments à cause de la barrière physique que représente les cellules externes.

Les gradients au sein d'un biofilm peuvent entraîner une différence d'expression qui génère une plus grande résistance. Par exemple, la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* est plus importante dans les biofilms (Mah et al., 2003).

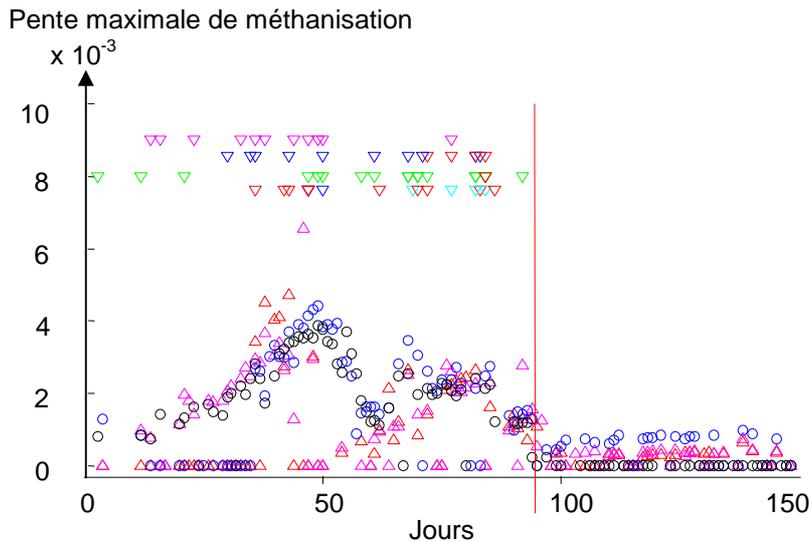
Les gradients au sein d'un biofilm sont d'autant plus importants que l'épaisseur de ces derniers (ou la taille des agrégats) est importante. Nous avons vu que l'histoire des digesteurs modifiaient leur diversité spécifique (en terme de phylotypes présents), mais nous avons également quantifié la taille des floccs présents dans nos digesteurs par un granulomètre.

En conclusion, l'histoire de la communauté ne semble pas induire des floccs de taille différente pendant les chocs que nous avons appliqués. Les différences observées sont par conséquent dues à un changement de communauté et non à une organisation spatiale différente. Avant d'observer de façon fine les changements structurels, nous allons décrire plus précisément les chocs appliqués aux réacteurs dans le paragraphe suivant.

#### **IV.4.5. Cohérence des indicateurs fonctionnels après le choc**

Nous avons vu que les perturbations préliminaires avaient un effet sur la résilience écologique au maximum de débit de biogaz. Il est également possible d'estimer le fonctionnement par l'augmentation du pH due à la consommation des acides intermédiaires de la digestion anaérobie par la méthanisation ( $p_m$ ). L'utilisation de cet indicateur suppose que les variations de pH du milieu en fonction de la concentration d'acide sont constantes au cours du temps.

Un algorithme a été écrit pour détecter automatiquement la pente  $p_m$ . Il est intéressant de voir que cet indicateur de fonction suit le même schéma global que le débit maximum de biogaz : Le fonctionnement des réacteurs estimé par la vitesse de méthanisation suggère que les deux réacteurs perturbés sont résilients. Bien que la conclusion générale soit identique, il semble que le débit maximal retourne à son état initial tandis que les vitesses de méthanisation ne soient que partiellement résilientes. Cependant, l'absence de mesures de pouvoir tampon ne permet pas d'interpréter ces résultats de façon robuste.



**Figure IV.4-10 : Résilience de la consommation d'acide (méthanisation), observée suite la variation de pH artificielle de 72h.**

Pente de méthanisation ( $p_m$ ) en fonction du temps. Le jour 1 représente l'inoculation des quatre réacteurs. Les deux réacteurs perturbés (triangles vers le haut) sont soumis à des perturbations externes (triangles vers le bas). Les réacteurs « stables » (ronds) sont maintenus dans des conditions stables.

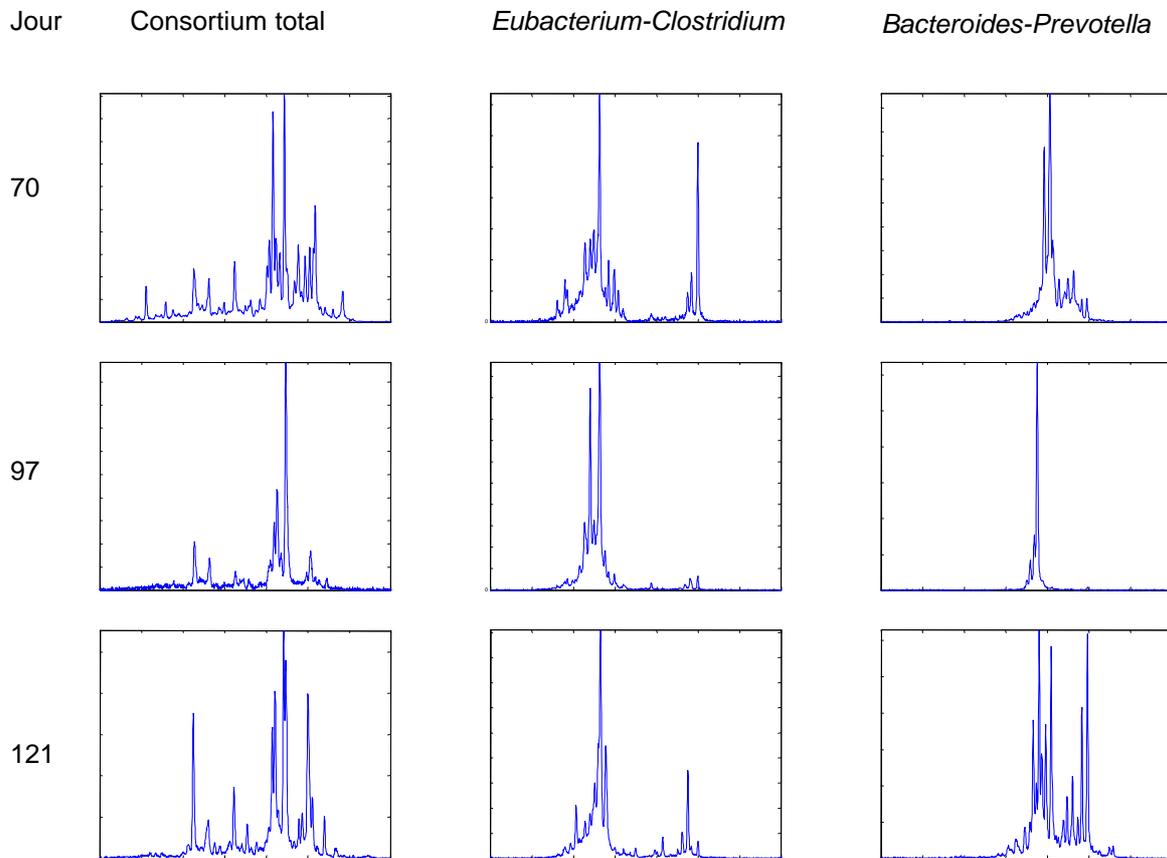
Les indicateurs fonctionnels sont donc cohérents et indiquent la même réponse de façon qualitative. Il serait intéressant de comparer ces données avec des modèles plus détaillés que le modèle de Moletta (Moletta et al., 1986) ou le modèle de Gavala (Gavala et al., 1996). Cependant, aucun modèle ne permet pour l'instant de prendre en compte de manière détaillée les voies de dégradation de l'éthanol. Celles-ci sont en cours d'élaboration dans le modèle ADM-1. Cependant, il est probable que certaines voies métaboliques soient plus affectées que d'autres car la réponse populationnelle à un choc pH varie selon les groupes microbiens. C'est ce que nous allons détailler dans le paragraphe suivant.

#### **IV.4.6. Réaction différente des groupes microbiens après le choc acide**

Lorsqu'une communauté microbienne est confrontée à un choc, sa richesse spécifique peut diminuer fortement. Il est également possible que les abondances relatives des différentes espèces change sans que la richesse spécifique soit modifiée.

Dans les réacteurs anaérobies, il est possible d'étudier précisément une partie de la communauté en sélectionnant des amorces adaptées lors de la PCR (voir annexe 4). Dans les réacteurs anaérobies que nous avons étudiés, les groupes bactériens ne réagissent pas de façon homogène au choc de pH. La dynamique de trois groupes microbiens présents dans un réacteur perturbé alimenté avec un substrat simple est représentée sur la Figure IV.4-11 : Le spectre « bactéries totales » est légèrement affecté par le choc à pH acide, le groupe *Eubacterium-Clostridium* est très peu affecté et le groupe *Bacteroides-Prevotella* connaît une diminution drastique de la richesse avant de se diversifier à nouveau. La différence de réponse des communautés *Eubacterium-*

*Clostridium* et *Bacteroides-Prevotella* se retrouve aussi bien dans les réacteurs « perturbés » et les réacteurs stables. Les petites perturbations n'ont pas d'effet visible sur la réaction structurelle de cette « sous diversité » en cas de choc.



**Figure IV.4-11 : Réaction de la micro-diversité à un choc pH majeur révélée par SSCP**

Analyses par CE-SSCP de divers groupes bactériens dans un réacteur « perturbé » alimenté par un substrat simple. Un choc artificiel de pH a été provoqué du jour 94 (addition d'acide) au jour 97 (addition de soude); 1<sup>ère</sup> colonne, SSCP des bactéries totales aux jours 70, 97 et 121; 2<sup>ème</sup> colonne, SSCP du groupe *Eubacterium-Clostridium* aux jours 70, 97 et 121; 3<sup>ème</sup> colonne, SSCP du groupe *Bacteroides-Prevotella* aux jours 70, 97 et 121.

Etant donné la grande variabilité de réponse entre les groupes microbiens, il semble difficile de considérer qu'un environnement fluctuant sélectionne *uniquement* des espèces à croissance rapide pour compenser les perturbations (stratégies « r ») ou tolérantes à ces perturbations (stratégie « K »).

La structure seule est insuffisante pour répondre à ces questions générales. Il serait intéressant de rendre ces données structurelles plus quantitatives en leur associant l'abondance relative de chacun des groupes, ainsi que leur importance fonctionnelle. Il serait alors intéressant de qualifier ces groupes en termes de groupe « conducteur » (régulant les conditions physico-chimiques du milieu) et « passager » (s'adaptant aux conditions physico-chimiques existantes).



### IV.5. Conclusions sur l'écosystème digestion anaérobie

En conclusion, les petites perturbations imposées aux réacteurs de digestion anaérobies:

- 1) ont modifié de façon détectable les abondances relatives des communautés lorsque le substrat était complexe
- 2) augmenté la résilience écologique de la vitesse de dégradation de la matière organique en cas de grand choc, mais un autre facteur non pris en compte dans l'expérience a pour conséquence des réponses qui peuvent différer entre réplicats
- 3) N'ont pas modifié l'évolution de tous les groupes bactériens de façon homogène : Les archées ne sont pas influencées, ni les *Bacteroides-Prevotella* ni les *Eubactérium-Clostridium*.

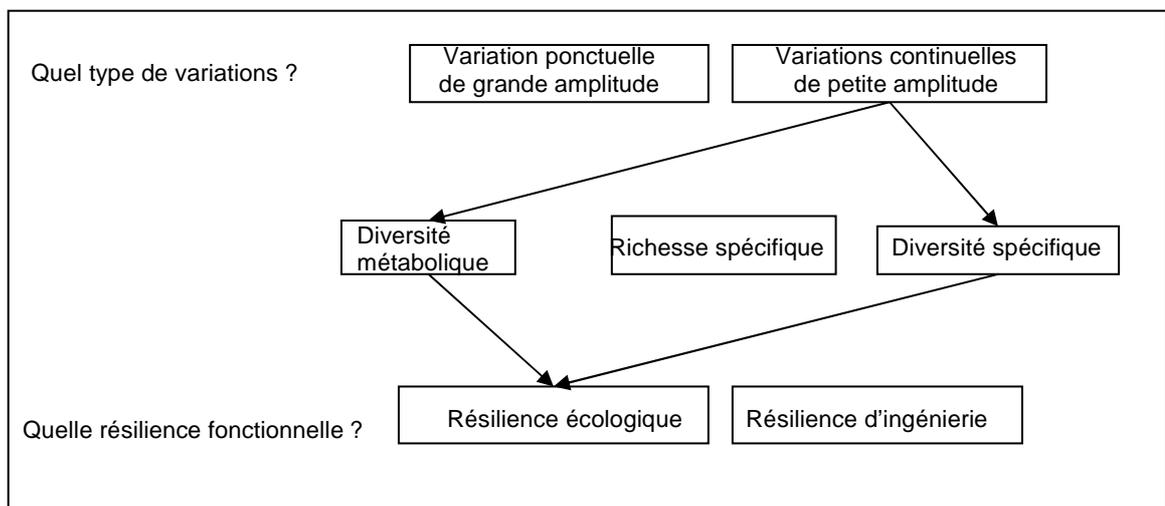


Figure IV.5-1 : Effet de petites perturbations sur la résilience fonctionnelle de digesteurs anaérobies

### IV.6. Développements potentiels modèle « digestion anaérobie »

La pratique montre qu'il est possible de conserver pendant plusieurs mois les boues anaérobies à température ambiante sans perte durable de la fonction. Il est par conséquent possible de stocker l'effluent quotidien afin d'accumuler une grande quantité d'inoculum qui pourra être utilisé au fur et à mesure pour ensemercer des réacteurs et tester la résilience fonctionnelle. Ainsi, plusieurs chocs pourraient être testés sur les mêmes communautés.

Nous avons testé trois amplitudes de choc différentes. Il serait cependant intéressant de tester une large gamme d'amplitude. Il serait ainsi possible de détecter une « rupture de pente » dans la vallée de stabilité. De plus, la forme de la vallée de stabilité pourrait dépendre du type de choc.

Ce travail montre l'importance de l'histoire de l'écosystème en cas de choc de pH, qu'il soit d'origine naturel (avec accumulation d'AGV) ou artificiel. Il serait maintenant extrêmement intéressant de quantifier la réaction de ces communautés anaérobies par rapport à d'autres chocs transitoires, comme un choc thermique par exemple. Les conséquences de choc thermique sont particulièrement intéressantes d'un point de vue applicatif. En effet, les phénomènes d'adaptation lors du passage d'un procédé mésophile à un procédé thermophile restent méconnus.

Un autre « choc » qui pourrait s'avérer extrêmement intéressant d'un point de vue théorique serait une dilution provoquée par une augmentation du débit. L'avantage de ce choc est qu'il est non sélectif et très bien maîtrisé. Cependant, étant donné la densité extrêmement importante de micro-organismes dans les bioréacteurs, la dilution nécessaire devrait probablement être très importante pour pouvoir caractériser un effet net. De plus, le taux de croissance relativement lent de la digestion anaérobie risque de rendre la recroissance après une dilution difficilement observable.

Nous avons été confrontés à la difficulté de relier phylogénie et fonction. Pour contourner ce problème, il serait peut-être intéressant d'utiliser un modèle de réacteur nitrifiant aérobie où les mécanismes principaux peuvent être liés à des groupes bactériens précis.

Associer une fonction aux groupes bactériens *Bacteroides-Prevotella* et *Eubacterium-Clostridium* est un défi majeur et risqué étant donné la diversité microbienne au sein de ces groupes. L'évolution des abondances de ces groupes au cours du temps pourrait donner une première approximation de leur importance fonctionnelle. Cependant, trouver « la fonction » de ces groupes bactériens pourrait éclairer leur dynamique sous un jour nouveau. En particulier, il serait intéressant de comparer des groupes « conducteurs » agissant sur les conditions physico-chimiques du milieu aux groupes « passagers » opportunistes. Les principes d'auto-organisation de ces groupes pourraient être différents ce qui pourrait avoir des conséquences sur le déterminisme de la sélection au sein de chacun de ces groupes.

Nous avons vu que des bioréacteurs conduits de façon similaire divergeaient. Cela peut être dû à des différences importantes au niveau microscopique qui restent inaccessibles par l'expérimentation macroscopique (par exemple, la vitesse d'agitation peu précise peut engendrer des différences de conditions hydrodynamiques potentiellement importantes). Cependant, nous allons voir dans le chapitre suivant qu'il est également possible que la divergence populationnelle entre bioréacteurs ne soit pas due à une imperfection expérimentale mais à un principe général d'évolution « aléatoire » des communautés microbiennes.

## CHAPITRE V : Conclusions et perspectives

<b><u>V.1. CONCLUSION GENERALE.....</u></b>	<b><u>172</u></b>
<b><u>V.2. DEVELOPPEMENTS POTENTIELS A COURT TERME.....</u></b>	<b><u>173</u></b>
V.2.1. DEVELOPPEMENTS POTENTIELS A COURT TERME DU MODELE « MILIEU MARIN »	
V.2.2. DEVELOPPEMENTS POTENTIELS A COURT TERME DU MODELE « DIGESTEUR »	
<b><u>V.3. PROBLEMATIQUES SOULEVEES PAR L'APPROCHE « CHEMOSTAT .....</u></b>	<b><u>174</u></b>
V.3.1. PROBLEMATIQUE DE L'ECHELLE D'OBSERVATION	
V.3.2. PROBLEMATIQUE DE LA METHODE D'OBSERVATION	
V.3.3. LES LIMITES DES MODELES D'ETUDES EN CHEMOSTATS	
V.3.4. PROBLEMATIQUE DU SEUIL D'INTENSITE POUR MARQUER LE SYSTEME	
V.3.5. PROBLEMATIQUE DE LA RELATION INTENSITE DU CHOC- DUREE DE LA « MEMOIRE »	
V.3.6. UNE DIVERGENCE DUE AU CHAOS DETERMINISTE ?	
V.3.7. UNE DIVERGENCE DUE A UNE EVOLUTION « NEUTRE » ?	
V.3.8. DES POPULATIONS « STABLES » NICHEES DANS UN CONSORTIUM DE DYNAMIQUE NEUTRE?	

## **V.1. Conclusion générale**

Dans le chapitre II, nous avons vu que les espèces « de faible abondance relative » participaient aux empreintes moléculaires proportionnellement à leur abondance. Dans certains cas, la faible abondance individuelle de ces espèces peut être compensée par leur grand nombre. L'interprétation de ces empreintes peut alors être plus raffinée que de « compter les pics ». Le logiciel SAFUM a permis d'obtenir plus de contrôle sur la manipulation des spectres SSCP et d'affiner l'interprétation.

Dans le chapitre III, nous avons vu que deux communautés marines d'origine différente présentaient les mêmes mécanismes en cas de choc [assimilation de la matière organique libérée par *Alteromonas*], avec de légères différences en termes de propriétés de croissance qui influent sur la résilience d'ingénierie. Cela montre qu'il est possible qu'une même espèce clé intervienne dans la résilience fonctionnelle de deux écosystèmes d'histoires contrastées. Cependant, malgré un phylotype de ADNr 16S identique, il semble que l'espèce originaire du littoral [où les conditions environnementales sont très fluctuantes] soit plus rapide à réagir en cas de choc libérant de la matière organique dans le milieu. Dans ce cas, il semble donc que l'histoire [la séquence d'événements] perçue par les bactéries littorales ait sélectionné une espèce caractérisée par une physiologie particulière.

Dans le chapitre IV, nous avons vu qu'il est possible de sélectionner des communautés anaérobies de résilience écologique différente en appliquant des perturbations de petite amplitude. Ces différentes communautés réagissent de la même façon à un choc modéré, mais les communautés ayant une histoire perturbée ont une plus grande probabilité de retrouver leur capacité de dégradation maximale après un choc acide. Cependant, même les réacteurs opérés en conditions « stables » ont une dynamique interne, ce qui prouve que les conditions environnementales « extérieures » ne sont pas les seuls facteurs intervenant dans la dynamique de la communauté microbienne. Cette dynamique est indépendante des perturbations.

En conclusion, l'histoire a un effet sur la résilience des communautés bactériennes mais seule une partie des événements est contrôlable par un expérimentateur.

Dans les paragraphes suivants, nous allons discuter des perspectives à court terme qui permettraient de compléter notre étude sur la résilience avant de proposer quelques problématiques qui ont été soulevées par nos résultats et qui pourraient faire l'objet d'études à plus long terme. Au cours de ce travail, je me suis heurté à quelques difficultés, dont certaines peuvent être contournées. De plus, certaines expériences pourraient être reproduites de façon légèrement différente. Nous allons détailler certains des points critiques limitant les conclusions dans le paragraphe suivant.

## **V.2. Développements potentiels à court terme**

### **V.2.1. Développements potentiels à court terme du modèle « milieu marin »**

Pour le modèle marin, nous avons évoqué précédemment quelques points qu'il serait très intéressant d'approfondir tel que caractériser un choc dilution en modifiant le débit [qui est un « choc »

très bien caractérisé], ajouter des ciliés [qui sont des prédateurs des bactéries], cultiver *Alteromonas* [pour préciser si les différences de reprise de croissance sont liées à un état physiologique différent ou à un écotype différent], et reproduire cette expérience en utilisant des inoculum prélevés à des mois différents [confirmant l'importance *in situ* tout au long de l'année du genre *Alteromonas*].

Les chemostats pourraient être utilisés pour étudier certains facteurs « forçant » la flore et par voie de conséquence la résilience. Par exemple, le lien entre phytoplancton et bactérioplancton reste encore peu étudié alors que le phytoplancton fournit une grande partie de la matière organique essentielle au bactérioplancton. En effet, il semble que le bactérioplancton soit à la fois corrélé à l'abondance de chlorophylle a et au type d'algues présentes (Pinhassi et al., 2004). Les chemostats pourraient permettre de coupler la physiologie fine du phytoplancton à la réaction du bactérioplancton.

Le lien entre le virioplancton et bactérioplancton a souvent été étudié sur des périodes de temps courtes à cause de l'effet confinement. Grâce à l'apport continu de matière organique qui maintient des conditions physico-chimiques stables, les chemostats pourraient être utilisés pour étudier cette relation sur un temps plus long. Ils permettraient par là-même d'étudier l'effet d'ajouts viraux réguliers au lieu d'un ajout ponctuel important.

D'une manière générale, je pense que l'effet confinement malgré un apport de nutriment est un paradoxe qui est étonnamment peu étudié dans la communauté marine. Je suis convaincu que les études visant à « retarder » ce phénomène pourraient être riches d'enseignements. Par exemple, il serait possible d'ajouter régulièrement des virus, afin de voir dans quelle mesure des « ondes » successives de virus permettent de maintenir une diversité spécifique. Il serait également possible d'étudier l'importance de la salinité sur l'infection (cf. Annexe 2) ou encore la co-évolution entre un phage et son hôte bactérien sur une longue période de temps.

### **V.2.2. Développements potentiels à court terme du modèle « digesteur »**

Nous avons vu qu'un système nitrifiant aurait pu être utilisé pour disposer d'un modèle où la phylogénie peut être reliée à la fonction du digesteur. De plus, il aurait été intéressant de caractériser la stabilité populationnelle et d'étudier un groupe fonctionnel comme les archées après le choc ou encore de quantifier les sous-groupes [pour préciser la divergence observée entre les chemostats].

D'une façon générale, l'expérience a montré que les digesteurs anaérobies étaient peu sensibles à un jeûne prolongé. Il aurait par conséquent été judicieux de conserver les communautés après leur sélection par de petites perturbations afin de tester la réponse à des chocs de façon statistiquement plus robuste. En particulier, nous avons vu que le pH était un paramètre environnemental crucial. Il aurait donc été extrêmement intéressant d'observer la réaction du consortium unique divisé en aliquotes subissant des chocs acides plus ou moins importants. Il aurait ainsi été possible d'identifier précisément un « pH de rupture », à partir duquel le retour à l'état initial n'est plus possible.

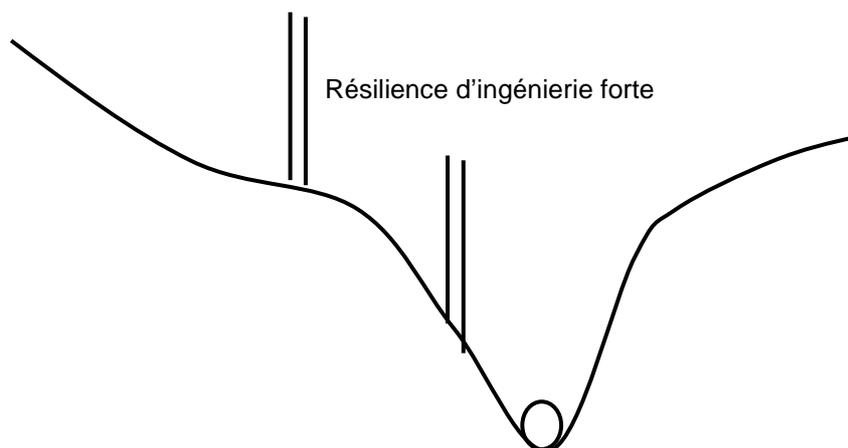
De nombreux chocs sur un même consortium auraient également permis de mieux caractériser la forme de la vallée de stabilité, et d'associer la cinétique de retour [résilience d'ingénierie] au déplacement par rapport à l'équilibre [résistance]. La résistance est souvent quantifiée en termes de pourcentage de changement par rapport à un témoin (Équation V.2-1). Il est possible

que la conformation de la vallée de stabilité change selon l'éloignement de l'équilibre (« rupture de pente »). Ainsi, dans la Figure V.2-1, la bille peut avoir une résilience d'ingénierie forte en cas de petit choc et faible si elle arrive dans la zone supérieure par un grand choc.

**Équation V.2-1 : Définition de la résistance**

$$Résist = \frac{Valeur_{témoin} - Valeur_{perturbé}}{Valeur_{témoin}}$$

Résilience d'ingénierie faible



**Figure V.2-1 : La résilience d'ingénierie du système peut dépendre de la déformation**

En outre, associer résistance et résilience peut être intéressant en terme de stratégie d'écosystème. Par exemple, il semblerait que pour certains sols, la réaction à un choc soit un compromis entre la résistance et la résilience fonctionnelle (Orwin et al., 2006b).

**V.3. Problématiques soulevées par l'approche « chemostat »**

**V.3.1. Problématique de l'échelle d'observation**

Depuis son apparition sous la plume de Wilson (1988), le mot « biodiversité » a été utilisé par beaucoup de communautés différentes. Ce mot peut recouvrir des concepts différents qui s'appliquent à des échelles différentes. Il peut être employé pour qualifier la diversité « génétique », qui caractérise la diversité des gènes au sein d'une espèce, la diversité « d'espèces », qui caractérise les variations entre espèces ou la diversité « de l'écosystème ». En effet, la diversité peut s'adresser à un individu, qui sera « divers » s'il est capable de dégrader un grand nombre de substrats, à une population qui sera diverse si plusieurs phénotypes sont présents dans cette population ou à une communauté, qui sera d'autant plus « diverse » qu'elle comporte beaucoup d'espèces *différentes*, réparties de manière homogène. La Table V-1 résume quelques définitions employées dans la littérature.

**Table V-1 : Différentes échelles de « diversité »**

DIVERSITE	Réf
Diversité métabolique (i.e. versatilité) (Combien de fonctions peut accomplir l'individu ?)	(Atlas et al., 1991)
Diversité physiologique (Propriétés de croissance différentes ?)	(Weinbauer et al., 2006)
Richesse spécifique (Combien d'espèces ?)	(Fox and McGrady-Steed, 2002, Zhang and Zhang, 2006 )
Diversité ressentie (« connectance ») (Combien d'espèces en relation directe ?)	(Rejmanek and Stary, 1979, Dunne et al., 2002)
Diversité spécifique (Quelles espèces ?)	(Griffiths et al., 2004)
Diversité spécifique relative (Quelles espèces ? Quelles abondances relatives ?)	(Girvan et al., 2005)

Il est donc évident que les événements agissant sur les micro-organismes vont avoir des conséquences fonctionnelles. En revanche, l'observation des systèmes microbiens est une problématique de taille car il n'est pas aisé de discerner la « brique élémentaire ». Au cours de ce travail, nous avons considéré expérimentalement une fonction constante dans le temps. Nous avons vu que cette fonction « stable » pouvait être assurée par un consortium dynamique. Ce fait pourrait être lié à une importante redondance fonctionnelle des micro-organismes qui reste mal comprise. En effet, le consortium est caractérisé par une stabilité à un certain niveau d'agrégation.

Il serait très intéressant d'identifier le niveau d'agrégation à partir duquel nous sommes capables d'identifier une stabilité [définir un « curseur » de stabilité]. Pour réaliser cela, il serait possible d'étudier des réacteurs de très petits volumes (entre quelques mL et quelques micromètres [pour isoler un floc], ou bien d'étudier un réacteur de grand volume avec des méthodes plus ou moins fines.

### **V.3.2. Problématique de la méthode d'observation**

En plus de leurs limites évoquées au chapitre II (notamment des problèmes de co-migration), les empreintes moléculaires fournissent des renseignements à propos de l'abondance relative des gènes ADNr 16S. Même en admettant que l'ADNr 16S est représentatif d'un contexte cellulaire, il ne représente en aucun cas la diversité potentielle à l'intérieur de ces contextes. De plus, les abondances relatives de deux espèces fonctionnellement redondantes peuvent évoluer alors que l'abondance de gène fonctionnel reste stable (la décroissance de l'espèce A est compensée par l'espèce B). On peut donc se demander dans quelle mesure la méthode basée sur un gène constitutif [comme le 16S] est représentative d'une fonction. Cela est d'autant plus vrai que des échanges horizontaux de matériel génétique peuvent transférer des fonctions entre des espèces bactériennes différentes.

Dans ce cadre, les gènes fonctionnels pourraient être un niveau d'observation intéressant. Dans les termes de R. Dawkins, on pourrait comparer un consortium bactérien à une foulditude de « barques de sauvetage » où les rameurs seraient les gènes fonctionnels. Ces barques de sauvetage se différencient des « navires eucaryotes » par la possibilité de certains gènes fonctionnels se propager rapidement d'une barque à l'autre. En considérant uniquement les gènes fonctionnels [indépendamment de leur « barque »], il serait possible de décrire un écosystème en terme de réseau de dégradation sans détailler le contexte cellulaire dans laquelle ces dégradations sont effectuées.

Il serait donc intéressant de chercher les raisons pour lesquelles certaines fonctions sont spécifiques des certains groupes. Par exemple, seules les archées semblent capables d'effectuer la méthanogénèse.

Un autre problème potentiel de notre méthode d'observation est que nous étudions peut-être une dynamique provenant de beaucoup de flocs en compétition. Il me semble possible que la dynamique observée à l'échelle moléculaire soit due en partie à des flocs présentant une structure spatiale. Une partie de la dynamique du consortium pourrait être due à une décolonisation/recolonisation permanente entre flocs.

Nous ignorons donc si nous devons rechercher le « curseur de stabilité » que nous évoquions au paragraphe précédent à une échelle plus précise [un seul flocc] ou plus en rapport avec les entités fonctionnelles [gènes fonctionnels].

### **V.3.3. Les limites des modèles d'études en chemostats**

Nous avons réalisé ces expériences à l'aide de chemostats. Les communautés marines ont été maintenues pendant un mois, et les communautés anaérobies ont été maintenues jusqu'à 150 jours. Les conditions de l'incubation sont particulières et ne « miment » pas tous les facteurs potentiellement structurants de l'environnement. Par exemple, les chemostats marins ne comportent pas de ciliés et ne sont pas soumis à un cycle jour/nuit pouvant maintenir les organismes photosynthétiques. De même, les digesteurs anaérobies de laboratoire sont homogènes et traitent des charges organiques très faibles par rapport aux procédés industriels.

Toutefois, les chemostats fournissent un modèle d'étude qui est d'autant plus intéressant qu'il permet d'éliminer un certain nombre de facteurs. Cela permet d'étudier un mécanisme particulier de façon détaillée. Par exemple, l'absence de zooplancton et des poissons planctonivores permet de soulever la problématique du rendement bactérien et de la redondance fonctionnelle des bactéries. Je pense qu'il est nécessaire de comprendre des modèles simples avant d'étudier des modèles complexes comportant un grand nombre de facteurs et de niveaux trophiques.

Ces modèles ont naturellement des limites en terme de prédiction *in situ*. Il sera évidemment impossible de prédire de façon fiable la réaction d'un écosystème complexe qui se modifie sur plusieurs échelles d'espace et de temps à partir de quelques expériences en chemostat. Par exemple, les hypothèses sur le rôle d'*Alteromonas in situ* restent spéculatives car beaucoup d'événements sont susceptibles d'orienter la diversité microbienne.

Il serait très intéressant d'étudier de près dans quelle mesure la conséquence d'un événement dépend de son amplitude. Par exemple, les chocs de très petite amplitude ne modifient probablement pas la communauté microbienne de façon mesurable.

#### **V.3.4. Problématique du seuil d'intensité pour marquer le système**

Nous avons vu que l'histoire des réacteurs de laboratoire et des communautés hétérotrophes marines avait une influence sur la résilience écologique et sur la résilience d'ingénierie. Cela implique que l'histoire laisse une empreinte sur la communauté. Cette empreinte concerne les propriétés de croissance de quelques « espèces » bactéries clés (milieu marin, chapitre III) ou la structure de la communauté (milieu anaérobie, chapitre IV).

Bien qu'il soit plus aisé d'étudier les conséquences d'un événement ponctuel de grande amplitude, les fluctuations environnementales continues peuvent laisser une « marque » durable. Par exemple, le facteur viral est souvent étudié en incubant un échantillon avec et sans virus (cad en appliquant un événement ponctuel de grande amplitude agissant sur toutes les bactéries simultanément). Or une communauté *in situ* est probablement soumise à des « ondes » successives de virus qui agissent chacune sur une petite fraction de bactéries sensibles.

Il serait intéressant de déterminer l'amplitude minimale à appliquer pour orienter la communauté bactérienne. En effet, il est probable que les très petites perturbations temporaires n'ont absolument aucun effet durable sur la communauté. De fait, il est probable que des petits chocs [réaction des bactéries au niveau physiologique] ont un effet moins durable que des grands chocs [qui ont un effet majeur sur la structure de la communauté]. Il serait donc peut-être plus pertinent de quantifier la relation entre l'intensité du choc et la durée de son effet plutôt que de parler de seuil d'intensité pour marquer le système.

#### **V.3.5. Problématique de la relation intensité du choc- durée de la « mémoire »**

La résilience peut être modifiée par des stress anciens de « grande » amplitude, comme le montrent les manipulations de communautés de sol (Table I-1), ou bien par des chocs répétés d'amplitude « modeste ». La séparation entre stress de « petite » et de « grande » amplitude est naturellement arbitraire pour séparer des événements qui se répartissent le long d'un continuum. Il semble raisonnable de penser que des stress de « grande » amplitude marquent la communauté bactérienne plus durablement que des stress de « petite » amplitude.

L'écosystème a une mémoire si des événements marquants laissent leur empreinte sur les propriétés fonctionnelles et populationnelles de l'écosystème. Beaucoup de facteurs environnementaux ont été étudiés pour tenter d'expliquer la dynamique des communautés bactériennes. Beaucoup d'observations suggèrent qu'ils sont susceptibles de laisser une empreinte sur la structure et les propriétés physiologiques des bactéries présentes dans l'écosystème (Table V-2).

La relation intensité du choc- durée de la « mémoire » permettrait de répondre à la question suivante : L'écosystème se « souvient-il » plus longtemps des « grands » événements ?

Table V-2: Evénements influençant la structure et la « physiologie » des communautés bactériennes

	Événement	Système	Observations	Références
Orientation par le haut (« topdown »)	Prédation (virus)	Eau de mer	Peut changer les espèces dominantes ou leurs propriétés physiologiques	(Weinbauer and Rassoulzadegan, 2004)
	Prédation (broutage)	Rivière et eau de mer	Peut induire de profonds changements dans la composition de la communauté	(Pernthaler, 2005)
	Perturbations intermédiaires	Cultures de plusieurs espèces	Peut augmenter la richesse spécifique et l'indice de Shannon basé sur la biomasse	(Sommer, 1995)
	Composé toxique	Eau de mer et sol	Nouvelles bandes sur des empreintes moléculaires	(Nayar et al., 2005, Kourtev et al., 2006)
Orientation par le bas (« Bottom up »)	Oxygène	Sol inondé	Les empreintes moléculaires peuvent être séparées statistiquement	(Noll et al., 2005)
	Limitation en phosphore ou en azote	Eau de mer	Nouvelles bandes sur des empreintes moléculaires	(Pinhassi et al., 2006)
	Limitation en Fer	Eau de mer	Modifie l'activité ectoenzymatique mais pas les empreintes moléculaires	(Arrieta et al., 2004)
	Identité des nutriments	Sol	Modifie la réponse catabolique et la composition en phospholipides	(Orwin et al., 2006c)
	Pluralité des nutriments	Sol	Peut augmenter la richesse spécifique et la diversité fonctionnelle	(Wawrik et al., 2005, Hallin et al., 2006)
	Périodicité des nutriments	Digesteurs	Peut induire des changements de composition ou de taux de croissance	(Xing et al., 1997a, Militza et al., 2006)

### **V.3.6. Une divergence due au chaos déterministe ?**

Les facteurs structurant la communauté de la Table V-2 reposent toujours sur un gain de « fitness ». La divergence de deux chemostats théoriquement identiques serait alors due à une différence infime dans les facteurs structurants ou à une légère différence des inoculums initiaux. Cette extrême sensibilité correspond à l'idée de chaos déterministe (Becks et al., 2005).

La divergence de chemostats soumis à des conditions identiques semble être un phénomène commun aux réacteurs anaérobies et aux chemostats inoculés avec des communautés marines. La divergence entre chemostats pourrait également être due à un « hasard » lors de la sélection entre deux bactéries fonctionnellement très semblables. Les modèles qui considèrent l'évolution d'entités sans avantage sélectif sont qualifiés de « modèles neutres ». C'est ce que nous allons voir dans le paragraphe suivant.

### **V.3.7. Une divergence due à une évolution « neutre » ?**

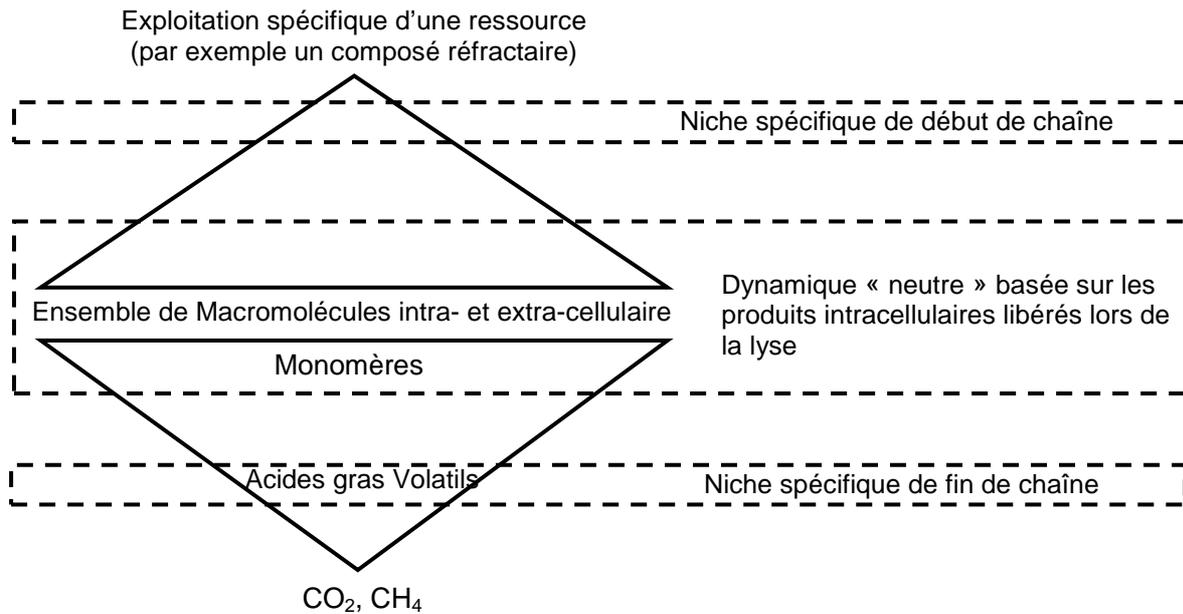
L'évolution de communautés microbiennes n'est peut-être pas déterministe. Le modèle neutre s'oppose au concept de « fitness » en considérant qu'aucune espèce ne possède d'avantage sélectif. Dans ce modèle, seul le « hasard » détermine quelle bactérie se reproduit. Bien que contre-intuitif et peu testé expérimentalement, ce modèle neutre semble cohérent avec la distribution des archées dans les digesteurs anaérobies (Sloan et al., 2006). Ce hasard [neutre] peut être décrit en terme de lois de probabilité (cf. Annexe 5). Remarquons qu'un système qui évolue aléatoirement à une vitesse constante peut être défini comme « stable ». La divergence entre chemostats pourrait être étudiée à la lumière de ce modèle neutre.

En particulier, le modèle neutre suggère que les groupes rares n'évoluent pas à la même vitesse que les groupes abondants. Dans le cas de la digestion anaérobie, il serait intéressant de quantifier les groupes *Eubacterium-Clostridium* et *Bacteroides-Prevotella*. En les considérant comme des sous-communautés, il serait alors possible de mettre en rapport leur vitesse de divergence et leur abondance relative. Cependant, les rares expériences menées pour confirmer une évolution selon un modèle neutre suggèrent que l'adaptation aux conditions environnementales est beaucoup plus importante que l'immigration (Manefield et al., 2007).

### **V.3.8. Des populations « stables » nichées dans un consortium de dynamique neutre?**

Nous avons constaté dans le milieu marin et dans les digesteurs anaérobies que les communautés bactériennes étaient dynamiques et divergentes. Dans les réacteurs anaérobies, nous avons observé une stabilité relative des communautés archées utilisant les produits de dégradation du compartiment bactérien. Cette stabilité, qui a également été observée par Fernandez et al. (1999) et Zumstein et al. (Zumstein et al., 2000), n'est observable que chez les archées. On peut dès lors se demander si certaines niches écologiques confèrent une certaine stabilité aux micro-organismes qui lui sont spécifiques. En d'autres termes, des niches stables seraient nichées dans un environnement instable.

Ces niches stables pourraient être constituées grâce à des conditions environnementales très spécifiques que peu d'espèces ont la capacité d'exploiter. Elles pourraient se trouver au début ou à la fin du réseau trophique (Figure V.3-1). Pour fixer les idées, ces niches stables pourraient être une particularité anabolique comme la capacité d'utiliser l'énergie lumineuse dans la zone photique des océans (par exemple *Synechococcus* ou *Prochlorococcus*). Elles pourraient également être la capacité spécifique de dégrader des composés comme des molécules réfractaires présentes dans l'alimentation humaine ou des acides gras volatils dans la digestion anaérobie au sein de bioréacteurs. La stabilité se ferait alors par une sélection « bottom-up », basée sur un avantage métabolique.



**Figure V.3-1 : Des niches spécifiques au sein du réseau trophique**

Les premières étapes de la digestion anaérobie font intervenir des molécules que beaucoup d'espèces sont capables d'assimiler. Dans le cas de la digestion de composés particuliers [comme la cellulose], il est possible que le début de la chaîne trophique soit une niche. Je pense que la lyse des organismes de cette niche pourrait libérer un ensemble de macromolécules aisément dégradables pour lesquels tous les micro-organismes sont « équivalents ». La SIP pourrait apporter des éléments de réponse à cette question. Par exemple, si l'on pouvait suivre les organismes assimilant les atomes de carbone de la cellulose, il serait possible de mieux comprendre le début du réseau trophique.

Cependant, afin de qualifier la stabilité des différents groupes microbiens, il est crucial de disposer d'une échelle de temps commune. En effet, il semble évident que deux systèmes très actifs se renouvelant rapidement [digesteurs thermophiles] divergeront plus rapidement que des systèmes peu actifs avec une forte rémanence des bactéries [sol gelé].

Pour quantifier cette divergence, il est crucial de pouvoir ramener les mesures de temps de divergence à une échelle de temps commune. Il me semble que l'échelle la plus appropriée serait le temps de génération des micro-organismes dans le système. A l'heure actuelle, il est facile d'avoir accès au temps de doublement de la biomasse, mais il n'est pas possible d'accéder directement au temps de génération moyen car il n'est pas possible de séparer la génération de biomasse de la mortalité. En d'autres termes, il est extrêmement difficile de savoir si les micro-organismes se reproduisent rapidement et sont lysés rapidement, ou s'ils se reproduisent lentement. En outre, il y a probablement une grande différence selon les groupes microbiens considérés. Je pense que qualifier quantitativement la vitesse de divergence des communautés bactériennes sera un enjeu majeur au cours des prochaines années.

---

## REFERENCES

- ACINAS, S. G., KLEPAC-CERAJ, V., HUNT, D. E., PHARINO, C., CERAJ, I., DISTEL, D. L. & POLZ, M. F. (2004a) Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community. *Nature*, 430, 551-4.
- ACINAS, S. G., MARCELINO, L. A., KLEPAC-CERAJ, V. & POLZ, M. F. (2004b) Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *Journal of Bacteriology*, 186, 2629-2635.
- AERTSEN, A. & MICHIELS, C. W. (2005) Diversify or die: Generation of diversity in response to stress. *Critical Reviews in Microbiology*, 31, 69-78.
- AHRING, B. K., ANGELIDAKI, I., CONWAY DE MACARIO, E., GAVALA, H. N., HOFMAN-BANG, J., MACARIO, A. J. L., OUDE ELFERINK, S. J. W. H., RASKIN, L., STAMS, A. J., WESTERMANN, P. & ZHENG, D. (2003) *Biomethanation I*, Berlin.
- ALLISON, G. (2004) The influence of species diversity and stress intensity on community resistance and resilience. *Ecological Monographs*, 74, 117-134.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J. H., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-3402.
- AMANN, R. I., LUDWIG, W. & SCHLEIFER, K. H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59, 143-169.
- AMMERMAN, J., FUHRMAN, J., HAGSTROEM, A. & AZAM, F. (1984) Bacterioplankton growth in seawater: I. Growth kinetics and cellular characteristics in seawater cultures. *Marine Ecology - Progress Series*, 18, 31-39.
- AN, Y. J., JOO, Y. H., HONG, I. Y., RYU, H. W. & CHO, K. S. (2004) Microbial characterization of toluene-degrading denitrifying consortia obtained from terrestrial and marine ecosystems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 611-619.
- ANDERSON, T. R. & DUCKLOW, H. W. (2001) Microbial loop carbon cycling in ocean environments studied using a simple steady-state model. *Aquatic Microbial Ecology*, 26, 37-49.
- ANGELIDAKI, I., ELLEGAARD, L. & AHRING, B. K. (1999) A comprehensive model of anaerobic bioconversion of complex substrates to biogas. *Biotechnology and Bioengineering*, 63, 363-372.
- ARCHER, D. B. & KIRSOP, B. H. (1990) The microbiology and control of anaerobic digestion. IN WHEATLEY, A. (Ed.) *Anaerobic Digestion, A Waste Treatment Technology*. London, Elsevier.
- ARRIETA, J. M., WEINBAUER, M. G., LUTE, C. & HERNDL, G. J. (2004) Response of bacterioplankton to iron fertilization in the Southern Ocean. *Limnology and Oceanography*, 49, 799-808.
- ASSOCIATION, A. P. H. (1992) *Standard methods for the Examination of Water and Wastewater*, Washington, DC.
- ATLAS, R. M. & BARTHA, R. (1993) *Microbial ecology: fundamental and applications*, California, Benjamin/Cummings Publishing Compagny.
- ATLAS, R. M., HOROWITZ, A., KRICHEVSKY, M. & BEJ, A. K. (1991) Response of Microbial-Populations to Environmental Disturbance. *Microbial Ecology*, 22, 249-256.
- AZAM, F. (1983) The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Marine Ecology-Progress Series*, 10, 257-263.
- AZAM, F. (1998) Microbial control of oceanic carbon flux: The plot thickens. *Science*, 280, 694-696.
- BAKER, G. C. & COWAN, D. A. (2004) 16 S rDNA primers and the unbiased assessment of thermophile diversity. *Biochem Soc Trans*, 32, 218-21.
- BARBAULT, R. & BLANDIN, P. la notion de stratégie adaptative sur quelques aspects énergétiques, démographiques et synécologiques. *Recherche d'écologie théorique*.
- BEARDSLEY, C., PERNTHALER, J., WOSNIOK, W. & AMANN, R. (2003) Are readily culturable bacteria in coastal North Sea waters suppressed by selective grazing mortality? *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2624-2630.
- BECKS, L., HILKER, F. M., MALCHOW, H., JURGENS, K. & ARNDT, H. (2005) Experimental demonstration of chaos in a microbial food web. *Nature*, 435, 1226-9.
- BEGON, M., HARPER, J. L. & TOWNSEND, C. (1996) *Ecology*
- BELL, G. (2000) The distribution of abundance in neutral communities. *American Naturalist*, 155, 606-617.
- BERNARD, L., COURTIES, C., DUPERRAY, C., SCHAFFER, H., MUYZER, G. & LEBARON, P. (2001) A new approach to determine the genetic diversity of viable and active bacteria in aquatic ecosystems. *Cytometry*, 43, 314-321.

- BERNARD, L., COURTIES, C., SERVAIS, P., TROUSSELLIER, M., PETIT, M. & LEBARON, P. (2000) Relationships among Bacterial Cell Size, Productivity, and Genetic Diversity in Aquatic Environments using Cell Sorting and Flow Cytometry. *Microbial Ecology*, 40, 148-158.
- BERNET, N., SANCHEZ, O., DABERT, P., OLAIZOLA, A., GODON, J. J. & DELGENES, J. P. (2004) Effect of solid hold-up on nitrite accumulation in a biofilm reactor - molecular characterization of nitrifying communities. *Water Science and Technology*, 49, 123-130.
- BERNEY, M., WEILENMANN, H. U., IHSEN, J., BASSIN, C. & EGLI, T. (2006) Specific growth rate determines the sensitivity of *Escherichia coli* to thermal, UVA, and solar disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2586-2593.
- BIDDANDA, B., OGDahl, M. & COTNER, J. (2001) Dominance of bacterial metabolism in oligotrophic relative to eutrophic waters. *Limnology and Oceanography*, 46, 730-739.
- BIRD, D. F. (1999) A critical examination of substoichiometric isotope dilution analysis using thymidine and leucine. *Scientia Marina*, 63, 71-70.
- BLANDIN, P., BARBAULT, R. & LECORDIER, C. (1976) Réflexions sur la notion d'écosystème : le concept de stratégie cénotiques. *Bulletin d'écologie*, 7, 391-410.
- BORJA, R. & BANKS, C. J. (1995) Response of an Anaerobic Fluidized-Bed Reactor Treating Ice-Cream Waste-Water to Organic, Hydraulic, Temperature and Ph Shocks. *Journal of Biotechnology*, 39, 251-259.
- BOTTON, S., VAN HEUSDEN, M., PARSONS, J. R., SMIDT, H. & VAN STRAALEN, N. (2006) Resilience of microbial systems towards disturbances. *Critical Reviews in Microbiology*, 32, 101-112.
- BOUALLAGUI, H., TORRIJOS, M., GODON, J. J., MOLETTA, R., BEN CHEIKH, R., TOUHAMI, Y., DELGENES, J. P. & HAMDY, M. (2004) Microbial monitoring by molecular tools of a two-phase anaerobic bioreactor treating fruit and vegetable wastes. *Biotechnology Letters*, 26, 857-862.
- BREITBART, M., HEWSON, I., FELTS, B., MAHAFFY, J. M., NULTON, J., SALAMON, P. & ROHWER, F. (2003) Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *Journal of Bacteriology*, 185, 6220-6223.
- BROWN, M. V., SCHWALBACH, M. S., HEWSON, I. & FUHRMAN, J. A. (2005) Coupling 16S-ITS rDNA clone libraries and automated ribosomal intergenic spacer analysis to show marine microbial diversity: development and application to a time series. *Environmental Microbiology*, 7, 1466-79.
- BUCKLING, A., KASSEN, R., BELL, G. & RAINEY, P. B. (2000) Disturbance and diversity in experimental microcosms. *Nature*, 408, 961-964.
- BUESING, N. & MARXSEN, J. (2005a) Theoretical and empirical conversion factors for determining bacterial production in freshwater sediments via leucine incorporation. *Limnology and Oceanography-Methods*, 3, 101-107.
- BUESING, N. & MARXSEN, J. (2005b) Theoretical and empirical conversion factors for determining bacterial production in freshwater sediments via leucine incorporation (vol 3, pg 101, 2005). *Limnology and Oceanography-Methods*, 3, 221-221.
- BURNS, J. A., ZÉHR, J. P. & CAPONE, D. G. (2002) Nitrogen-fixing phylotypes of Chesapeake Bay and Neuse River estuary sediments. *Microbial Ecology*, 44, 336-343.
- BUTTON, D. K. & ROBERTSON, B. R. (2001) Determination of DNA content of aquatic bacteria by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1636-1645.
- CALLON, C., DELBES, C., DUTHOIT, F. & MONTEL, M. C. (2006) Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 172-80.
- CAMPBELL, B. J., ENGEL, A. S., PORTER, M. L. & TAKAI, K. (2006) The versatile epsilon-proteobacteria: key players in sulphidic habitats. *Nat Rev Microbiol*, 4, 458-68.
- CAROPPO, C., STABILI, L., ARESTA, M., CORINALDESI, C. & DANOVARO, R. (2006) Impact of heavy metals and PCBs on marine picoplankton. *Environmental Toxicology*, 21, 541-551.
- CARPENTER, S. R., KRAFT, C. E., WRIGHT, R., HE, X., SORANNO, P. A. & HODGSON, J. R. (1992) Resilience and resistance of a lake phosphorus cycle before and after food web manipulation. *American Naturalist*, 140, 781-798.
- CASAMAYOR, E. O., CALDERON-PAZ, J. I. & PEDROS-ALIO, C. (2000) 5S rRNA fingerprints of marine bacteria, halophilic archaea and natural prokaryotic assemblages along a salinity gradient. *FEMS Microbiology Ecology*, 34, 113-119.
- CASES, I. & DE LORENZO, V. (2002) The grammar of (micro)biological diversity. *Environmental Microbiology*, 4, 623-627.

- CEREMONIE, H., BURET, F., SIMONET, P. & VOGEL, T. M. (2006) Natural electrotransformation of lightning-competent *Pseudomonas* sp strain N3 in artificial soil microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2385-2389.
- CHACKHIANI, M., DABERT, P., ABZIANIDZE, T., PARTSKHALADZE, G., TSIKLARI, L., DUDAURI, T. & GODON, J. J. (2004) 16S rDNA characterisation of bacterial and archaeal communities during start-up of an anaerobic thermophilic digestion of cattle manure. *Bioresource Technology*, 93, 227-232.
- CHEN, K. & PACTER, L. (2005) Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities. *Plos Computational Biology*, 1, 106-112.
- COLBERG, P. J. (1988) Anaerobic microbial degradation of cellulose, lignin, oligolignols, and monoaromatic lignin derivatives. IN ZEHNDER, A. J. B. (Ed.) *Biology of Anaerobic Microorganisms*. New York, John Wiley & Sons.
- COLE, J. J., PACE, M. L., CARPENTER, S. R. & KITCHELL, J. F. (2000) Persistence of net heterotrophy in lakes during nutrient addition and food web manipulations. *Limnology and Oceanography*, 45, 1718-1730.
- COLLINS, G., MAHONY, T. & O'FLAHERTY, V. (2006) Stability and reproducibility of low-temperature anaerobic biological wastewater treatment. *FEMS Microbiology Ecology*, 55, 449-458.
- COTTINGHAM, K. L., BROWN, B. L. & LENNON, J. T. (2001) Biodiversity may regulate the temporal variability of ecological systems  
doi:10.1046/j.1461-0248.2001.00189.x. *Ecology Letters*, 4, 72-85.
- COTTINGHAM, K. L., GLAHOLT, S. & BROWN, A. C. (2004) Zooplankton community structure affects how phytoplankton respond to nutrient pulses. *Ecology*, 85, 158-171.
- COTTINGHAM, K. L. & SCHINDLER, D. E. (2000) Effects of grazer community structure on phytoplankton response to nutrient pulses. *Ecology*, 81, 183-200.
- CRESSON, R. (2006) Etude du démarrage de procédés intensifs de méthanisation Impact des conditions hydrodynamiques et de la stratégie de montée en charge sur la formation et l'activité du biofilm. *Sciences et procédés biologiques et industriels*. Montpellier, MONTPELLIER II.
- CROPP, R. & GABRIC, A. (2002) Ecosystem adaptation: Do ecosystems maximize resilience? *Ecology*, 83, 2019-2026.
- CUNHA, M. A., ALMEIDA, M. A. & ALCANTARA, F. (2001) Short-Term Responses of the Natural Planktonic Bacterial Community to the Changing Water Properties in an Estuarine Environment: Ecto enzymatic Activity, Glucose Incorporation, and Biomass Production. *Microbial Ecology*, 42, 69-79.
- CURTIS, T. P. & SLOAN, W. T. (2004) Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Curr Opin Microbiol*, 7, 221-6.
- CURTIS, T. P. & SLOAN, W. T. (2006) Towards the design of diversity: stochastic models for community assembly in wastewater treatment plants. *Water Science and Technology*, 54, 227-236.
- CURTIS, T. P., SLOAN, W. T. & SCANNELL, J. W. (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 10494-10499.
- DABERT, P., DELGENES, J. P. & GODON, J. J. (2005) Monitoring the impact of bioaugmentation on the start up of biological phosphorus removal in a laboratory scale activated sludge ecosystem. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, 575-588.
- DABERT, P., FLEURA-LESSARD, A., MOUNIER, E., DELGENES, J. P., MOLETTA, R. & GODON, J. J. (2001a) Monitoring of the microbial community of a sequencing batch reactor bioaugmented to improve its phosphorus removal capabilities. *Water Science and Technology*, 43, 1-8.
- DABERT, P., SIALVE, B., DELGENES, J. P., MOLETTA, R. & GODON, J. J. (2001b) Characterisation of the microbial 16S rDNA diversity of an aerobic phosphorus-removal ecosystem and monitoring of its transition to nitrate respiration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 500-509.
- DAHLLOF, I., BAILLIE, H. & KJELLEBERG, S. (2000) rpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3376-3380.
- DALHOFF, A., MATUTAT, S. & ULLMANN, U. (1995) Effect of quinolones against slowly growing bacteria. *Chemotherapy*, 41, 92-9.
- DAWKINS, R. (2006) *The Selfish Gene: 30th Anniversary Edition--with a new Introduction by the Author*, Oxford, Oxford University Press.

- DE LA COCHETIERE, M. F., DURAND, T., LEPAGE, P., BOURREILLE, A., GALMICHE, J. P. & DORE, J. (2005) Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short-course antibiotic challenge. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 5588-5592.
- DE VRIES, J. & WACKERNAGEL, W. (2004) Microbial horizontal gene transfer and the DNA release from transgenic crop plants. *Plant and Soil*, 266, 91-104.
- DEANGELIS, D. L., BARTELL, S. M. & BRENKERT, A. L. (1989) Effects of nutrient cycling and food chain length on resilience. *American Naturalist*, 134, 778-805.
- DEGENS, B. P., SCHIPPER, L. A., SPARLING, G. P. & DUNCAN, L. C. (2001) Is the microbial community in a soil with reduced catabolic diversity less resistant to stress or disturbance? *Soil Biology & Biochemistry*, 33, 1143-1153.
- DELBÈS, C., LECLERC, M., ZUMSTEIN, E., GODON, J. J. & MOLETTA, R. (2001a) A molecular method to study population and activity dynamics in anaerobic digesters. *Water Science and Technology*, 43, 51-57.
- DELBÈS, C., MOLETTA, R. & GODON, J. J. (2000) Monitoring of activity dynamics of an anaerobic digester bacterial community using 16S rRNA polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology*, 2, 506-15.
- DELBÈS, C., MOLETTA, R. & GODON, J. J. (2001b) Bacterial and archaeal 16S rDNA and 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*, 35, 19-26.
- DEWOODY, Y. D., SWIHART, R. K., CRAIG, B. A. & GOHEEN, J. R. (2003) Diversity and stability in communities structured by asymmetric resource allocation. *American Naturalist*, 162, 514-27.
- DIEZ, B., PEDROS-ALIO, C., MARSH, T. L. & MASSANA, R. (2001) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2942-2951.
- DOLZANI, L., TONIN, E., LAGATOLLA, C. & MONTIBRAGADIN, C. (1994) Typing of *Staphylococcus Aureus* by Amplification of the 16s-23s Ribosomal-Rna Intergenic Spacer Sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 119, 167-173.
- DUNBAR, J., BARNS, S. M., TICKNOR, L. O. & KUSKE, C. R. (2002) Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3035-3045.
- DUNBAR, J., TAKALA, S., BARNS, S. M., DAVIS, J. A. & KUSKE, C. R. (1999) Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1662-1669.
- DUNNE, J. A., WILLIAMS, R. J. & MARTINEZ, N. D. (2002) Network structure and biodiversity loss in food webs: robustness increases with connectance. *Ecology Letters*, 5, 558-567.
- EILERS, H., PERNTHALER, J. & AMANN, R. (2000a) Succession of pelagic marine bacteria during enrichment: a close look at cultivation-induced shifts. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4634-4640.
- EILERS, H., PERNTHALER, J., GLOCKNER, F. O. & AMANN, R. (2000b) Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3044-3051.
- ENG, R. H., PADBERG, F. T., SMITH, S. M., TAN, E. N. & CHERUBIN, C. E. (1991) Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 35, 1824-8.
- ENGELHARDT, K. A. M. & KADLEC, J. A. (2001) Species traits, species richness and the resilience of wetlands after disturbance. *Journal of Aquatic Plant Management*, 39, 36-39.
- FEKETE, R. A., MILLER, M. J. & CHATTORAJ, D. K. (2003) Fluorescently labeled oligonucleotide extension: a rapid and quantitative protocol for primer extension. *Biotechniques*, 35, 90-+.
- FERGUSON, R. L., BUCKLEY, E. N. & PALUMBO, A. V. (1984) Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. *Applied and Environmental Microbiology*, 47, 49-55.
- FERNANDEZ, A., HASHSHAM, S. A., DOLLHOPF, S. L., RASKIN, L., GLAGOLEVA, O., DAZZO, F. B., HICKEY, R. F., CRIDDLE, C. S. & TIEDJE, J. M. (2000a) Flexible community structure correlates with stable community function in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4058-4067.
- FERNANDEZ, A., HUANG, S., SESTON, S., XING, J., HICKEY, R., CRIDDLE, C. & TIEDJE, J. (1999) How stable is stable? Function versus community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 3697-704.
- FERNANDEZ, A. S., HASHSHAM, S. A., DOLLHOPF, S. L., RASKIN, L., GLAGOLEVA, O., DAZZO, F. B., HICKEY, R. F., CRIDDLE, C. S. & TIEDJE, J. M. (2000b) Flexible community structure

- correlates with stable community function in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4058-67.
- FISCHER, J. M., KLUG, J. L., IVES, A. R. & FROST, T. M. (2001) Ecological history affects zooplankton community responses to acidification. *Ecology*, 82, 2984-3000.
- FISHER, M. M. & TRIPLETT, E. W. (1999) Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Microbial Diversity and Its Application to Freshwater Bacterial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4630-4636.
- FJELLBIRKELAND, A., TORSVIK, V. & OVREAS, L. (2001) Methanotrophic diversity in an agricultural soil as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis profiles of *pmoA*, *mxaF* and 16S rDNA sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 79, 209-17.
- FLATEN, G. A. F., CASTBERG, T., TANAKA, T. & THINGSTAD, T. F. (2003) Interpretation of nutrient-enrichment bioassays by looking at sub-populations in a marine bacterial community. *Aquatic Microbial Ecology*, 33, 11-18.
- FLODER, S. & SOMMER, U. (1999) Diversity in planktonic communities: An experimental test of the intermediate disturbance hypothesis. *Limnology and Oceanography*, 44, 1114-1119.
- FOX, J. W. & MCGRADY-STEED, J. (2002) Stability and complexity in microcosm communities. *Journal of Animal Ecology*, 71, 749-756.
- FRANKLIN, R. B. & MILLS, A. L. (2006) Structural and functional responses of a sewage microbial community to dilution-induced reductions in diversity. *Microbial Ecology*, 52, 280-288.
- FROMIN, N., HAMELIN, J., TARNAWSKI, S., ROESTI, D., JOURDAIN-MISEREZ, K., FORESTIER, N., TEYSSIER-CUVELLE, S., GILLET, F., ARAGNO, M. & ROSSI, P. (2002) Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology*, 4, 634-643.
- FRONTIER, S. (2004) *Ecosystèmes*, Paris, Dunod.
- FROSTEGARD, A., COURTOIS, S., RAMISSE, V., CLERC, S., BERNILLON, D., LE GALL, F., JEANNIN, P., NESME, X. & SIMONET, P. (1999) Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 5409-5420.
- FUHRMAN, J. A., HEWSON, I., SCHWALBACH, M. S., STEELE, J. A., BROWN, M. V. & NAEEM, S. (2006) Annually reoccurring bacterial communities are predictable from ocean conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 13104-13109.
- FUKAMI, T. (2001) Sequence effects of disturbance on community structure. *Oikos*, 92, 215-224.
- GARCIA-CALDERON, D., BUFFIÈRE, P., MOLETTA, R. & ELMALEH, S. (1998) Anaerobic digestion of wine distillery wastewater in down-flow fluidized bed. *Water Research*, 31, 3593-3600.
- GARCIA-MARTINEZ, J., ACINAS, S. G., ANTON, A. I. & RODRIGUEZ-VALERA, F. (1999) Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 36, 55-64.
- GARCIA-MARTINEZ, J., ACINAS, S. G., MASSANA, R. & RODRIGUEZ-VALERA, F. (2002) Prevalence and microdiversity of *Alteromonas macleodii*-like microorganisms in different oceanic regions. *Environmental Microbiology*, 4, 42-50.
- GARNIER, E., CORTEZ, J., BILLES, G., NAVAS, M. L., ROUMET, C., DEBUSSCHE, M., LAURENT, G., BLANCHARD, A., AUBRY, D., BELLMANN, A., NEILL, C. & TOUSSAINT, J. P. (2004) Plant functional markers capture ecosystem properties during secondary succession. *Ecology*, 85, 2630-2637.
- GAVALA, H. N., SKIADAS, I. V., BOZINIS, N. A. & LYBERATOS, G. (1996) Anaerobic codigestion of agricultural industries' wastewaters. *Water Science and Technology*, 34, 67-75.
- GEETS, J., BOON, N. & VERSTRAETE, W. (2006) Strategies of aerobic ammonia-oxidizing bacteria for coping with nutrient and oxygen fluctuations. *FEMS Microbiology Ecology*, 58, 1-13.
- GENTILE, M., YAN, T., TIQUIA, S. M., FIELDS, M. W., NYMAN, J., ZHOU, J. & CRIDDLE, C. S. (2006) Stability in a denitrifying fluidized bed reactor. *Microbial Ecology*, 52, 311-321.
- GENTRY, T. J., WICKHAM, G. S., SCHADT, C. W., HE, Z. & ZHOU, J. (2006) Microarray applications in microbial ecology research. *Microbial Ecology*, 52, 159-175.
- GHIGLIONE, J. F., LARCHER, M. & LEBARON, P. (2005) Spatial and temporal scales of variation in bacterioplankton community structure in the NW Mediterranean Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, 40, 229-240.
- GILLER, K. E., WITTER, E. & MCGRATH, S. P. (1998) Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. *Soil Biology & Biochemistry*, 30, 1389-1414.
- GINZBURG, L. R. & AKAÇAKAYA, H. R. (1992) Consequences of ratio-dependent predation for steady-state properties of ecosystems. *Ecology*, 73, 1536-1543.

- GIOVANNONI, S. J., BRITSCHGI, T. B., MOYER, C. L. & FIELD, K. G. (1990) Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*, 345, 60-63.
- GIRVAN, M. S., CAMPBELL, C. D., KILLHAM, K., PROSSER, J. I. & GLOVER, L. A. (2005) Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environmental Microbiology*, 7, 301-313.
- GLICK, B. R. (1995) The Enhancement of Plant-Growth by Free-Living Bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 109-117.
- GODON, J. J., DUTHOIT, F., DELBES, C., MILLET, L. & MONTEL, M. C. (2001) Use of molecular fingerprint for the study of complex microbial ecosystem. Application to AOC Salers cheese. *Lait*, 81, 257-262.
- GODON, J. J., MORINIERE, J., MOLETTA, M., GAILLAC, M., BRU, V. & DELGENES, J. P. (2005) Rarity associated with specific ecological niches in the bacterial world: the 'Synergistes' example. *Environmental Microbiology*, 7, 213-224.
- GODON, J. J., ZUMSTEIN, E., DABERT, P., HABOUZIT, F. & MOLETTA, R. (1997a) Microbial 16S rDNA diversity in an anaerobic digester. *Water Science and Technology*, 36, 49-55.
- GODON, J. J., ZUMSTEIN, E., DABERT, P., HABOUZIT, F. & MOLETTA, R. (1997b) Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 2802-2813.
- GOLDENFELD, N. & WOESE, C. (2007) Biology's next revolution. *Nature*, 445, 369.
- GONZALEZ-ESCALONA, N., ROMERO, J. & ESPEJO, R. T. (2005) Polymorphism and gene conversion of the 16S rRNA genes in the multiple rRNA operons of *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiology Letters*, 246, 213-219.
- GONZALEZ, A. & DESCAMPS-JULIEN, B. (2004) Population and community variability in randomly fluctuating environments. *Oikos*, 106, 105-116.
- GOODWIN, K. D., TOKARCZYK, R., STEPHENS, F. C. & SALTZMAN, E. S. (2005) Description of toluene inhibition of methyl bromide biodegradation in seawater and isolation of a marine toluene oxidizer that degrades methyl bromide. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 3495-3503.
- GREEN, J. & BOHANNAN, B. J. M. (2006) Spatial scaling of microbial biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 21, 501-507.
- GREEN, J. L., HOLMES, A. J., WESTOBY, M., OLIVER, I., BRISCOE, D., DANGERFIELD, M., GILLINGS, M. & BEATTIE, A. J. (2004) Spatial scaling of microbial eukaryote diversity. 432, 747-750.
- GRIFFITHS, B. S., HALLETT, P. D., KUAN, H. L., PITKIN, Y. & AITKEN, M. N. (2005) Biological and physical resilience of soil amended with heavy metal-contaminated sewage sludge. *European Journal of Soil Science*, 56, 197-205.
- GRIFFITHS, B. S., KUAN, H. L., RITZ, K., GLOVER, L. A., MCCAIG, A. E. & FENWICK, C. (2004) The relationship between microbial community structure and functional stability, tested experimentally in an upland pasture soil. *Microbial Ecology*, 47, 104-113.
- GRIFFITHS, B. S., RITZ, K., BARDGETT, R. D., COOK, R., CHRISTENSEN, S., EKELUND, F., SORENSEN, S. J., BAATH, E., BLOEM, J., DE RUITER, P. C., DOLFING, J. & NICOLARDOT, B. (2000) Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity-ecosystem function relationship. *Oikos*, 90, 279-294.
- GROVER, J. P. (1997) *Resource Competition*, Springer.
- GUNDERSON, L. H. (2000) Ecological resilience - in theory and application. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 31, 425-439.
- HAGSTROEM, A., AMMERMAN, J., HENRICH, S. & AZAM, F. (1984) Bacterioplankton growth in seawater: II. Organic matter utilization during steady-state growth in seawater cultures. . *Marine ecology progress series*, 18, 41-48.
- HALL, J. A., FELNAGLE, E., FRIES, M., SPEARING, S., MONACO, L. & STEELE, A. (2006) Evaluation of cell lysis procedures and use of a micro fluidic system for an automated DNA-based cell identification in interplanetary missions. *Planetary and Space Science*, 54, 1600-1611.
- HALLIN, S., THROBACK, I. N., DICKSVED, J. & PELL, M. (2006) Metabolic profiles and genetic diversity of denitrifying communities in activated sludge after addition of methanol or ethanol. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 5445-5452.
- HARDING, S. (2001) Complexity and stability in a Gaian Ecosystem Model. *Earth System Science, Proceedings of international School Earth and Planetary Sciences Siena*.

- HARMAND, J., PAULOU, L., DESMOUTIERS, J., GARRELLY, L., DABERT, P. & GODON, J. J. (2006) The microbial signature of drinking waters: myth or reality? *Water Science and Technology*, 53, 259-266.
- HASHSHAM, S. A., FERNANDEZ, A. S., DOLLHOPF, S. L., DAZZO, F. B., HICKEY, R. F., TIEDJE, J. M. & CRIDDLE, C. S. (2000) Parallel processing of substrate correlates with greater functional stability in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4050-4057.
- HENDRICKX, B., DEJONGHE, W., BOENNE, W., BRENNEROVA, M., CERNIK, M., LEDERER, T., BUCHELI-WITSCHER, M., BASTIAENS, L., VERSTRAETE, W., TOP, E. M., DIELS, L. & SPRINGAEL, D. (2005) Dynamics of an oligotrophic bacterial aquifer community during contact with a groundwater plume contaminated with benzene toluene, ethylbenzene, and xylenes: an in situ mesocosm study. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 3815-3825.
- HENDRICKX, B., DEJONGHE, W., FABER, F., BOENNE, W., BASTIAENS, L., VERSTRAETE, W., TOP, E. M. & SPRINGAEL, D. (2006) PCR-DGGE method to assess the diversity of BTEX mono-oxygenase genes at contaminated sites. *FEMS Microbiology Ecology*, 55, 262-273.
- HEWSON, I. & FUHRMAN, J. A. (2004) Richness and diversity of bacterioplankton species along an estuarine gradient in Moreton Bay, Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3425-33.
- HEWSON, I. & FUHRMAN, J. A. (2006) Viral impacts upon marine bacterioplankton assemblage structure. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 86, 577-589.
- HEWSON, I., STEELE, J. A., CAPONE, D. G. & FUHRMAN, J. A. (2006) Temporal and spatial scales of variation in bacterioplankton assemblages of oligotrophic surface waters. *Marine Ecology-Progress Series*, 311, 67-77.
- HOLLING (1996) Engineering resilience versus ecological resilience. XXXXXx.
- HOOPER, D. U., CHAPIN, F. S., EWEL, J. J., HECTOR, A., INCHAUSTI, P., LAVOREL, S., LAWTON, J. H., LODGE, D. M., LOREAU, M., NAEEM, S., SCHMID, B., SETALA, H., SYMSTAD, A. J., VANDERMEER, J. & WARDLE, D. A. (2005) Effects of biodiversity on ecosystem functioning: A consensus of current knowledge. *Ecological Monographs*, 75, 3-35.
- HORI, T., HARUTA, S., UENO, Y., ISHII, M. & IGARASHI, Y. (2006) Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 1623-1630.
- HOSHINO, T., TERAHARA, T., YAMADA, K., OKUDA, H., SUZUKI, I., TSUNEDA, S., HIRATA, A. & INAMORI, Y. (2006) Long-term monitoring of the succession of a microbial community in activated sludge from a circulation flush toilet as a closed system. *FEMS Microbiology Ecology*, 55, 459-470.
- HOSKISSON, P. A. & HOBBS, G. (2005) Continuous culture - making a comeback? *Microbiology-Sgm*, 151, 3153-3159.
- HUBBELL, S. P. (2001) *The Unified Theory of Biodiversity and Biogeography*, New Jersey.
- HUGHES, J. B., HELLMANN, J. J., RICKETTS, T. H. & BOHANNAN, B. J. M. (2001) Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4399-4406.
- HUTCHINSON, G. E. (1961) The paradox of the plankton. *American Naturalist*, XCV, 137-145.
- HWU, C. S., DONLON, B. & LETTINGA, G. (1996) Comparative toxicity of long-chain fatty acid to anaerobic sludges from various origins. *Water Science and Technology*, 34, 351-358.
- INANC, B., MATSUI, S. & IDE, S. (1999) Propionic acid accumulation in anaerobic digestion of carbohydrates: An investigation on the role of hydrogen gas. *Water Science and Technology*, 40, 93-100.
- ISKEN, S. & DE BONT, J. A. M. (1998) Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles*, 2, 229-238.
- ISKEN, S., DERKS, A., WOLFFS, P. F. G. & DE BONT, J. A. M. (1999) Effect of organic solvents on the yield of solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2631-2635.
- IVES, A. R. (1995a) Measuring Resilience in Stochastic-Systems. *Ecological Monographs*, 65, 217-233.
- IVES, A. R. (1995b) Predicting the Response of Populations to Environmental-Change. *Ecology*, 76, 926-941.
- IVES, A. R., KLUG, J. L. & GROSS, K. (2000) Stability and species richness in complex communities. *Ecology Letters*, 3, 399-411.
- IZQUIERDO, J. A. & NUSSLEIN, K. (2006) Distribution of extensive nifH gene diversity across physical soil microenvironments. *Microbial Ecology*, 51, 441-452.

- JACKSON, R. W. & DEMOSS, J. A. (1965) Effects of toluene on *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 90, 1420-5.
- JASPERS, E. & OVERMANN, J. (2004) Ecological significance of microdiversity: Identical 16S rRNA gene sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysologies. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4831-4839.
- JENSEN, M. A. & STRAUS, N. (1993) Effect of Pcr Conditions on the Formation of Heteroduplex and Single-Stranded-DNA Products in the Amplification of Bacterial Ribosomal DNA Spacer Regions. *Pcr-Methods and Applications*, 3, 186-194.
- JOHNSTON, A. W. B., LI, Y. G. & OGILVIE, L. (2005) Metagenomic marine nitrogen fixation - feast or famine? *Trends in Microbiology*, 13, 416-420.
- JOUENNE, T., MOR, A., BONATO, H. & JUNTER, G. A. (1998) Antibacterial activity of synthetic dermaseptins against growing and non-growing *Escherichia coli* cultures. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, 42, 87-90.
- JUOTTONEN, H., GALAND, P. E., TUUTTILA, E.-S., LAINE, J., FRITZE, H. & YRJALA, K. (2005) Methanogen communities and Bacteria along an ecohydrological gradient in a northern raised bog complex. *Environmental Microbiology*, 7, 1547-1557.
- KAEWPIPAT, K. & GRADY, C. P. L. (2002) Microbial population dynamics in laboratory-scale activated sludge reactors. *Water Science and Technology*, 46, 19-27.
- KANAGAWA, T. (2003a) Bias and Artifacts in Multitemplate Polymerase Chain Reaction (PCR). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96, 317-323.
- KANAGAWA, T. (2003b) Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96, 317-323.
- KARTHIKEYAN, S., WOLFAARDT, G. M., KORBER, D. R. & CALDWELL, D. E. (1999) Functional and structural responses of a degradative microbial community to substrates with varying degrees of complexity in chemical structure. *Microbial Ecology*, 38, 215-224.
- KASSEN, R., BUCKLING, A., BELL, G. AND RAINEY, P.B. (2000) Diversity peaks at intermediate productivity in a laboratory microcosm. *Nature*, 406, 508-512.
- KEMP, P. F. & ALLER, J. Y. (2004) Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiology Ecology*, 47, 161-177.
- KEYSER, M., WITTHUHN, R. C. & BRITZ, T. J. (2006) PCR-based denaturing gradient gel electrophoretic evaluation of changes in the non-methanogenic population of stressed upflow anaerobic sludge blanket granules. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22, 1041-1048.
- KING, S., MCCORD, B. R. & RIEFLER, R. G. (2005) Capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism analysis for monitoring soil bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 60, 83-92.
- KNIETSCH, A., WASCHKOWITZ, T., BOWIEN, S., HENNE, A. & DANIEL, R. (2003) Metagenomes of complex microbial consortia derived from different soils as sources for novel genes conferring formation of carbonyls from short-chain polyols on *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 5, 46-56.
- KOHLER, F., HAMELIN, J., GILLET, F., GOBAT, J.-M. & BUTTLER, A. (2005) Soil Microbial Community Changes in Wooded Mountain Pastures due to Simulated Effects of Cattle Grazing. *Plant and Soil*, 278, 327-340.
- KOIDE, T., VENCIO, R. Z. N. & GOMES, S. L. (2006) Global gene expression analysis of the heat shock response in the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Journal of Bacteriology*, 188, 5821-5830.
- KOURTEV, P. S., NAKATSU, C. H. & KONOPKA, A. (2006) Responses of the anaerobic bacterial community to addition of organic C in chromium(VI)- and iron(III)-amended microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 628-637.
- KOWALCHUK, G. A. & STEPHEN, J. R. (2001) Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annual Reviews of Microbiology*, 55, 485-529.
- KRISTENSEN, N. P., GABRIC, A., BRADDOCK, R. & CROPP, R. (2003) Is maximizing resilience compatible with established ecological goal functions? *Ecological Modelling*, 169, 61-71.
- KUAN, H. L., FENWICK, C., GLOVER, L. A., GRIFFITHS, B. S. & RITZ, K. (2006) Functional resilience of microbial communities from perturbed upland grassland soils to further persistent or transient stresses. *Soil Biology & Biochemistry*, 38, 2300-2306.
- LAKAY, F. M., BOTHA, A. & PRIOR, B. A. (2007) Comparative analysis of environmental DNA extraction and purification methods from different humic acid-rich soils. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 265-273.

- LAMONTAGNE, M. G., MICHEL, F. C., HOLDEN, P. A. & REDDY, C. A. (2002) Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 49, 255-264.
- LAU, I. W. C. & FANG, H. H. P. (1997) Effect of temperature shock to thermophilic granules. *Water Research*, 31, 2626-2632.
- LEBARON, P., CATALA, P. & PARTHUISOT, N. (1998) Effectiveness of SYTOX Green stain for bacterial viability assessment. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2697-700.
- LEBARON, P. & JOUX, F. (1994) Flow Cytometric Analysis of the Cellular DNA Content of *Salmonella-Typhimurium* and *Alteromonas-Haloplanktis* During Starvation and Recovery in Seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 4345-4350.
- LEBARON, P., SERVAIS, P., AGOGUE, H., COURTIES, C. & JOUX, F. (2001a) Does the high nucleic acid content of individual bacterial cells allow us to discriminate between active cells and inactive cells in aquatic systems? *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1775-1782.
- LEBARON, P., SERVAIS, P., TROUSSELLIER, M., COURTIES, C., MUYZER, G., BERNARD, L., SCHAFFER, H., PUKALL, R., STACKEBRANDT, E., GUINDULAIN, T. & VIVES-REGO, J. (2001b) Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in abundances, activity and composition. *FEMS Microbiology Ecology*, 34, 255-266.
- LEBARON, P., SERVAIS, P., TROUSSELLIER, M., COURTIES, C., VIVES-REGO, J., MUYZER, G., BERNARD, L., GUINDULAIN, T., SCHAFFER, H. & STACKEBRANDT, E. (1999) Changes in bacterial community structure in seawater mesocosms differing in their nutrient status. *Aquatic Microbial Ecology*, 19, 255-267.
- LECLERC, M., DELBES, C., MOLETTA, R. & GODON, J. (2001) Single strand conformation polymorphism monitoring of 16S rDNA Archaea during start-up of an anaerobic digester. *FEMS Microbiology Ecology*, 34, 213-220.
- LEE, S. H. & FUHRMAN, J. A. (1991) Species Composition Shift of Confined Bacterioplankton Studied at the Level of Community DNA. *Marine Ecology-Progress Series*, 79, 195-201.
- LEGENDRE, P. & LEGENDRE, L. (1998) *Numerical ecology*, Amsterdam, The Netherlands, Elsevier.
- LEHMANN-ZIEBARTH, N. & R. IVES, A. (2006) The structure and stability of model ecosystems assembled in a variable environment. *Oikos*, 114, 451-464.
- LEITAO, R. C., SANTAELLA, S. T., VAN HAANDEL, A. C., ZEEMAN, G. & LETTINGA, G. (2006a) The effects of hydraulic and organic shock loads on the robustness of upflow anaerobic sludge blanket reactors treating sewage. *Water Science and Technology*, 54, 49-55.
- LEITAO, R. C., VAN HAANDEL, A. C., ZEEMAN, G. & LETTINGA, G. (2006b) The effects of operational and environmental variations on anaerobic wastewater treatment systems: A review. *Bioresource Technology*, 97, 1105-1118.
- LESER, T. D., AMENUVOR, J. Z., JENSEN, T. K., LINDECORONA, R. H., BOYE, M. & MOLLER, K. (2002) Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 673-690.
- LEWIS, K. (2007) Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews Microbiology*, 5, 48-56.
- LIIRI, M., SETALA, H., HAIMI, J., PENNANEN, T. & FRITZE, H. (2002) Relationship between soil microarthropod species diversity and plant growth does not change when the system is disturbed. *Oikos*, 96, 137-149.
- LILES, M. R., MANSKE, B. F., BINTRIM, S. B., HANDELSMAN, J. & GOODMAN, R. M. (2003) A census of rRNA genes and linked genomic sequences within a soil metagenomic library. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2684-2691.
- LIU, W. T., MARSH, T. L., CHENG, H. & FORNEY, L. J. (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4516-4522.
- LOISEL, P., HARMAND, J., ZEMB, O., LATRILLE, E., LOBRY, C., DELGENES, J. P. & GODON, J. J. (2006) Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environmental Microbiology*, 8, 720-731.
- LOPEZ-FLORES, R., BOIX, D., BADOSA, A., BRUCET, S. & QUINTANA, X. D. (2006) Pigment composition and size distribution of phytoplankton in a confined Mediterranean salt marsh ecosystem. *Marine Biology*, 149, 1313-1324.
- LOREAU, M. & BEHERA, N. (1999) Phenotypic diversity and stability of ecosystem processes. *Theoretical Population Biology*, 56, 29-47.
- LOVELOCK, J. (1979) *Gaia : a new look on earth*, New York.

- LOVELOCK, J. (2006) *The Revenge of Gaia: Why the Earth Is Fighting Back - and How We Can Still Save Humanity*.
- LOY, A., SCHULZ, C., LUCKER, S., SCHOPFER-WENDELS, A., STOECKER, K., BARANYI, C., LEHNER, A. & WAGNER, M. (2005) 16S rRNA gene-based oligonucleotide microarray for environmental monitoring of the betaproteobacterial order "Rhodocyclales". *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 1373-1386.
- LOZUPONE, C., HAMADY, M. & KNIGHT, R. (2006) UniFrac - An online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. *Bmc Bioinformatics*, 7.
- LYONS, K. G., BRIGHAM, C. A., TRAUT, B. H. & SCHWARTZ, M. W. (2005) Rare species and ecosystem functioning. *Conservation Biology*, 19, 1019-1024.
- MACARTHUR, R. & WILSON, E. O. (1967) *The theory of island biogeography*, Princeton University Press.
- MAH, T. F., PITTS, B., PELLOCK, B., WALKER, G. C., STEWART, P. S. & O'TOOLE, G. A. (2003) A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*, 426, 306-310.
- MAH, T. F. C. & O'TOOLE, G. A. (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9, 34-39.
- MALMSTROM, R. R., COTTRELL, M. T., ELIFANTZ, H. & KIRCHMAN, D. L. (2005) Biomass production and assimilation of dissolved organic matter by SAR11 bacteria in the Northwest Atlantic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 2979-2986.
- MANFIELD, M., GRIFFITHS, R. I., LEIGH, M. B., FISHER, R. & WHITELEY, A. S. (2005) Functional and compositional comparison of two activated sludge communities remediating coking effluent. *Environmental Microbiology*, 7, 715-22.
- MANFIELD, M., WHITELEY, A., CURTIS, T. & WATANABE, K. (2007) Influence of Sustainability and Immigration in Assembling Bacterial Populations of Known Size and Function. *Microbial Ecology*.
- MANFIELD, M., WHITELEY, A. S., OSTLE, N., INESON, P. & BAILEY, M. J. (2002) Technical considerations for RNA-based stable isotope probing: an approach to associating microbial diversity with microbial community function. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16, 2179-2183.
- MANN, N. H., COOK, A., MILLARD, A., BAILEY, S. & CLOKIE, M. (2003) Marine ecosystems: Bacterial photosynthesis genes in a virus. *Nature*, 424, 741.
- MARTIN-LAURENT, F., PHILIPPOT, L., HALLET, S., CHAUSSOD, R., GERMON, J. C., SOULAS, G. & CATROUX, G. (2001) DNA extraction from soils: Old bias for new microbial diversity analysis methods (vol 67, pg 2354, 2001). *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4397-4397.
- MARTIN, A. P. (2002) Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3673-3682.
- MASSANA, R. & JURGENS, K. (2003) Composition and population dynamics of planktonic bacteria and bacterivorous flagellates in seawater chemostat cultures. *Aquatic Microbial Ecology*, 32, 11-22.
- MASSOL-DEYA, A., ODELSON, D. A., HICKEY, R. F. & TIEDJE, J. M. (1995) Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). IN AKKERMANS, A. D. L., DIRK VAN ELSAS, J. & DE BRUIJN, F. J. (Eds.) *Molecular Microbial Ecology Manual*. Dordrecht/ Boston/ London, Kluwer Academic Publishers.
- MAY, R. M. (1973) *Stability and complexity in model ecosystems*, New jersey.
- MAY, R. M. (Ed.) (1981) *Theoretical Ecology : Principles and Applications*, Oxford.
- MCARTHUR, R. (1955) Fluctuations of Animal Populations and a Measure of Community Stability. *Ecology*, 36, 533-536.
- MCINERNEY, M. J. (1988) Anaerobic hydrolysis and fermentation of fats and proteins. IN ZEHNDER, A. J. B. (Ed.) *Biology of Anaerobic Microorganisms*. New York, John Wiley & Sons.
- MIDDELBOE, M., HAGSTROM, A., BLACKBURN, N., SINN, B., FISCHER, U., BORCH, N. H., PINHASSI, J., SIMU, K. & LORENZ, M. G. (2001) Effects of Bacteriophages on the Population Dynamics of Four Strains of Pelagic Marine Bacteria. *Microbial Ecology*, 42, 395-406.
- MILITZA, C. C. N., NAKATSU, C. H. & KONOPKA, A. (2006) Effect of nutrient periodicity on microbial community dynamics. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3175-3183.
- MITTELBACH, G. G., TURNER, A. M., HALL, D. J., RETTIG, J. E. & OSENBURG, C. W. (1995) Perturbation and Resilience - a Long-Term, Whole-Lake Study of Predator Extinction and Reintroduction. *Ecology*, 76, 2347-2360.

- MOHAPATRA, B. R. & FUKAMI, K. (2004) Comparison of the numerical grazing response of two marine heterotrophic nanoflagellates fed with different bacteria. *Journal of Sea Research*, 52, 99-107.
- MOLETTA, R., VERRIE, D. & ALBAGNAC, G. (1986) *Water Research*.
- MOORE, J. C., DE RUITER, P. C. & HUNT, H. W. (1993a) Influence of Productivity on the Stability of Real and Model Ecosystems. *Science*, 261, 906-908.
- MOORE, J. C., DE RUITER, P. C. & HUNT, H. W. (1993b) Influence of Productivity on the Stability of Real and Model Ecosystems  
10.1126/science.261.5123.906. *Science*, 261, 906-908.
- MUYZER, G., DE WAAL, C. & UITTERLINDEN, A. G. (1993) Profiling of a complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 695-700.
- MUYZER, G. & SMALLA, K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 73, 127-141.
- NAEEM, S. & LI, S. B. (1997) Biodiversity enhances ecosystem reliability. *Nature*, 390, 507-509.
- NAGATA, T. & KIRCHMAN, D. L. (1996) Bacterial degradation of protein adsorbed to model submicron particles in seawater. *Marine Ecology-Progress Series*, 132, 241-248.
- NAKATSU, C. H., CARMOSINI, N., BALDWIN, B., BEASLEY, F., KOURTEV, P. & KONOPKA, A. (2005) Soil microbial community responses to additions of organic carbon substrates and heavy metals (Pb and Cr). *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 7679-7689.
- NAKATSU, C. H., TORSVIK, V. & OVREAS, L. (2000) Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Science Society of America Journal*, 64, 1382-1388.
- NARANG, R. & DUNBAR, J. (2004) Modeling bacterial species abundance from small community surveys. *Microbial Ecology*, 47, 396-406.
- NAYAR, S., GOH, B. P. L. & CHOU, L. M. (2005) Environmental impacts of diesel fuel on bacteria and phytoplankton in a tropical estuary assessed using in situ mesocosms. *Ecotoxicology*, 14, 397-412.
- NEUBERT, M. G. & CASWELL, H. (1997) Alternatives to resilience for measuring the responses of ecological systems to perturbations. *Ecology*, 78, 653-665.
- NEUMANN, G., VEERANAGOUDA, Y., KAREGOUDAR, T. B., SAHIN, O., MAUSEZAHN, I., KABELITZ, N., KAPPELMEYER, U. & HEIPIEPER, H. J. (2005) Cells of *Pseudomonas putida* and *Enterobacter* sp adapt to toxic organic compounds by increasing their size. *Extremophiles*, 9, 163-168.
- NOGUCHI, H., PARK, J. & TAKAGI, T. (2006) MetaGene: prokaryotic gene finding from environmental genome shotgun sequences. *Nucleic Acids Research*, 34, 5623-5630.
- NOLL, M., MATTHIES, D., FRENZEL, P., DERAKSHANI, M. & LIESACK, W. (2005) Succession of bacterial community structure and diversity in a paddy soil oxygen gradient. *Environmental Microbiology*, 7, 382-395.
- O'NEILL, R. V. (1976) Ecosystem persistence and heterotrophic regulation. *Ecology*, 57, 1244-1253.
- ORWIN, K. H. & WARDLE, D. A. (2004) New indices for quantifying the resistance and resilience of soil biota to exogenous disturbances. *Soil Biology & Biochemistry*, 36, 1907-1912.
- ORWIN, K. H., WARDLE, D. A. & GREENFIELD, L. G. (2006a) Context-dependent changes in the resistance and resilience of soil microbes to an experimental disturbance for three primary plant chronosequences  
*Oikos*, 112, 196-208.
- ORWIN, K. H., WARDLE, D. A. & GREENFIELD, L. G. (2006b) Context-dependent changes in the resistance and resilience of soil microbes to an experimental disturbance for three primary plant chronosequences. *Oikos*, 112, 196-208.
- ORWIN, K. H., WARDLE, D. A. & GREENFIELD, L. G. (2006c) Ecological consequences of carbon substrate identity and diversity in a laboratory study. *Ecology*, 87, 580-593.
- OVREAS, L., BOURNE, D., SANDAA, R. A., CASAMAYOR, E. O., BENLLOCH, S., GODDARD, V., SMERDON, G., HELDAL, M. & THINGSTAD, T. F. (2003) Response of bacterial and viral communities to nutrient manipulations in seawater mesocosms. *Aquatic Microbial Ecology*, 31, 109-121.
- OVREAS, L. & TORSVIK, V. (1998) Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microbial Ecology*, 36, 303-315.
- PACE, N. R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276, 734-740.

- PAUL, J. H. (1999) Microbial gene transfer: an ecological perspective. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1, 45-50.
- PEDROS-ALIO, C. (2006) Genomics and marine microbial ecology. *International Microbiology*, 9, 191-197.
- PERNTHALER, A., PERNTHALER, J., EILERS, H. & AMANN, R. (2001) Growth patterns of two marine isolates: Adaptations to substrate patchiness? *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4077-4083.
- PERNTHALER, J. (2005) Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 537-546.
- PERNTHALER, J. & AMANN, R. (2005) Fate of heterotrophic microbes in pelagic habitats: Focus on populations. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69, 440-+.
- PETERSON, G., ALLEN, C. R. & HOLLING, C. S. (1998) Ecological resilience, biodiversity, and scale. *Ecosystems*, 1, 6-18.
- PETT-RIDGE, J. & FIRESTONE, M. K. (2005) Redox fluctuation structures microbial communities in a wet tropical soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 6998-7007.
- PEU, P., BRUGERE, H., POURCHER, A. M., KEROUREDAN, M., GODON, J. J., DELGENES, J. P. & DABERT, P. (2006) Dynamics of a pig slurry microbial community during anaerobic storage and management. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3578-3585.
- PIMM, S. L. (1979a) Complexity and stability: another look at MacArthur's original hypothesis. *Oikos*, 33, 351-357.
- PIMM, S. L. (1979b) The structure of food webs. *Theoretical Population Biology*, 16, 144-158.
- PIMM, S. L. (Ed.) (1982) *Food webs*, London.
- PIMM, S. L. & LAWTON, J. H. (1977) Number of trophic levels in ecological communities. *Nature*, 268, 329-331.
- PIND, P. F., ANGELIDAKI, I. & AHRING, B. K. (2003) Dynamics of the anaerobic process: Effects of volatile fatty acids. *Biotechnology and Bioengineering*, 82, 791-801.
- PINHASSI, J., GOMEZ-CONSARNAU, L., ALONSO-SAEZ, L., SALA, M. M., VIDAL, M., PEDROS-ALIO, C. & GASOL, J. M. (2006) Seasonal changes in bacterioplankton nutrient limitation and their effects on bacterial community composition in the NW Mediterranean Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, 44, 241-252.
- PINHASSI, J., SALA, M. M., HAVSKUM, H., PETERS, F., GUADAYOL, O., MALITS, A. & MARRASE, C. L. (2004) Changes in bacterioplankton composition under different phytoplankton regimens. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 6753-6766.
- POMMIER, T., PINHASSI, J. & HAGSTROM, A. (2005) Biogeographic analysis of ribosomal RNA clusters from marine bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 41, 79-89.
- PROCTOR, L. M. & FUHRMAN, J. A. (1992) Mortality of Marine-Bacteria in Response to Enrichments of the Virus Size Fraction from Seawater. *Marine Ecology-Progress Series*, 87, 283-293.
- PUKALL, R., PAUKER, O., BUNTEFUSS, D., ULRICHS, G., LEBARON, P., BERNARD, L., GUINDULAIN, T., VIVES-REGO, J. & STACKEBRANDT, E. (1999) High sequence diversity of *Alteromonas macleodii*-related cloned and cellular 16S rDNAs from a Mediterranean seawater mesocosm experiment. *FEMS Microbiology Ecology*, 28, 335-344.
- QUINCE, C., HIGGS, P. G. & MCKANE, A. J. (2005) Deleting species from model food webs. *Oikos*, 110, 283-296.
- RAJAPAKSHA, R., TOBOR-KAPLON, M. A. & BAATH, E. (2004) Metal toxicity affects fungal and bacterial activities in soil differently. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2966-2973.
- RANJARD, L., ECHAIRI, A., NOWAK, V., LEJON, D. P., NOUAIM, R. & CHAUSSOD, R. (2006a) Field and microcosm experiments to evaluate the effects of agricultural Cu treatment on the density and genetic structure of microbial communities in two different soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 58, 303-15.
- RANJARD, L., LIGNIER, L. & CHAUSSOD, R. (2006b) Cumulative effects of short-term polymetal contamination on soil bacterial community structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 1684-7.
- RANJARD, L., POLY, F., LATA, J. C., MOUGEL, C., THIOULOUSE, J. & NAZARET, S. (2001) Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: Biological and methodological variability. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4479-4487.
- RASOOL, S. A., IJAZ, S. & SUBHAN, S. A. (2003) Hydrocarbon degradation by marine bacteria: Screening and genetic manipulation. *Pakistan Journal of Botany*, 35, 37-44.
- REJMANEK, M. & STARY, P. (1979) Connectance in real biotic communities and critical values for stability of model ecosystems. *Nature*, 280, 311 - 313

- REKHA, P. D., LAI, W. A., ARUN, A. B. & YOUNG, C. C. (2007) Effect of free and encapsulated *Pseudomonas putida* CC-FR2-4 and *Bacillus subtilis* CC-pg104 on plant growth under gnotobiotic conditions. *Bioresource Technology*, 98, 447-451.
- RICHMOND, C. E., BREITBURG, D. L. & ROSE, K. A. (2005) The role of environmental generalist species in ecosystem function. *Ecological Modelling*, 188, 279-295.
- RIEMANN, B. & BELL, R. T. (1990) Advances in estimating bacterial biomass and growth in aquatic systems. *Archiv Fur Hydrobiologie*, 118, 385-402.
- RITCHIE, M. E. & OLFF, H. (1999) Spatial scaling laws yield a synthetic theory of biodiversity. *Nature*, 400, 557-560.
- RITCHIE, N. J., SCHUTTER, M. E., DICK, R. P. & MYROLD, D. D. (2000) Use of length heterogeneity PCR and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1668-75.
- ROCAP, G., LARIMER, F. W., LAMERDIN, J., MALFATTI, S., CHAIN, P., AHLGREN, N. A., ARELLANO, A., COLEMAN, M., HAUSER, L., HESS, W. R., JOHNSON, Z. I., LAND, M., LINDELL, D., POST, A. F., REGALA, W., SHAH, M., SHAW, S. L., STEGLICH, C., SULLIVAN, M. B., TING, C. S., TOLONEN, A., WEBB, E. A., ZINSER, E. R. & CHISHOLM, S. W. (2003) Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature*, 424, 1042-1047.
- RONDON, M. R., AUGUST, P. R., BETTERMANN, A. D., BRADY, S. F., GROSSMAN, T. H., LILES, M. R., LOIACONO, K. A., LYNCH, B. A., MACNEIL, I. A., MINOR, C., TIONG, C. L., GILMAN, M., OSBURNE, M. S., CLARDY, J., HANDELSMAN, J. & GOODMAN, R. M. (2000) Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2541-2547.
- ROONEY, N., MCCANN, K., GELLNER, G. & MOORE, J. C. (2006) Structural asymmetry and the stability of diverse food webs. *Nature*, 442, 265-269.
- RUIZ, C., TORRIJOS, M., SOUSBIE, P., MARTINEZ, J. L., MOLETTA, R. & DELGENES, J. P. (2002) Treatment of winery wastewater by an anaerobic sequencing batch reactor. *Water Science and Technology*, 45, 219-224.
- SADEGHIFARD, N., GURTLER, V., BEER, M. & SEVIOUR, R. J. (2006) The mosaic nature of intergenic 16S-23S rRNA spacer regions suggests rRNA operon copy number variation in *Clostridium difficile* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 7311-7323.
- SAISON, C., DEGRANGE, V., OLIVER, R., MILLARD, P., COMMEAUX, C., MONTANGE, D. & LE ROUX, X. (2005) Alteration and resilience of the soil microbial community following compost amendment: effects of compost level and compost-borne microbial community. *Environmental Microbiology*, 8, 247-257.
- SCHAFER, H., BERNARD, L., COURTIES, C., LEBARON, P., SERVAIS, P., PUKALL, R., STACKEBRANDT, E., TROUSSELLIER, M., GUINDULAIN, T., VIVES-REGO, J. & MUYZER, G. (2001) Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. *FEMS Microbiology Ecology*, 34, 243-253.
- SCHAFER, H., SERVAIS, P. & MUYZER, G. (2000) Successional changes in the genetic diversity of a marine bacterial assemblage during confinement. *Archives of Microbiology*, 173, 138-45.
- SCHAUER, M., MASSANA, R. & PEDROS-ALIO, C. (2000) Spatial differences in bacterioplankton composition along the Catalan coast (NW Mediterranean) assessed by molecular fingerprinting. *FEMS Microbiology Ecology*, 33, 51-59.
- SCHEFFER, M., CARPENTER, S., FOLEY, J. A., FOLKE, C. & WALKER, B. (2001) Catastrophic shifts in ecosystems. *Nature*, 413, 591-596.
- SCHIERHOLZ, J. M., BEUTH, J. & PULVERER, G. (1998) Killing effects of antibiotics and two-fold antimicrobial combinations on proliferating and non growing staphylococci. *Zentralbl Bakteriol*, 288, 527-39.
- SCHMALENBERGER, A. & TEBBE, C. C. (2003) Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies. *Molecular Ecology*, 12, 251-262.
- SCHULZE, E. D. & MOONEY, H. A. (1994) *Biodiversity and Ecosystem Function*, New York.
- SEBAT, J. L., COLWELL, F. S. & CRAWFORD, R. L. (2003) Metagenomic profiling: Microarray analysis of an environmental genomic library. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4927-4934.
- SERVAIS, P. & LAVANDIER, P. (1995) Mesures de production bactérienne par incorporation de thymidine et de leucine marquées : discussion des protocoles expérimentaux et exemples d'application. *Océanis*, 21, 161-189.

- SHARMA, A. K., SPUDICH, J. L. & DOOLITTLE, W. F. (2006) Microbial rhodopsins: functional versatility and genetic mobility. *Trends in Microbiology*, 14, 463-469.
- SHI, W., BISCHOFF, M., TURCO, R. & KONOPKA, A. (2002) Long-term effects of chromium and lead upon the activity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*, 21, 169-177.
- SHIPLEY, B., VILE, D. & GARNIER, E. (2006) From Plant Traits to Plant Communities: A Statistical Mechanistic Approach to Biodiversity. *Science*, 314, 812-814.
- SHURIN, J. B., BORER, E. T., SEABLOOM, E. W., ANDERSON, K., BLANCHETTE, C. A., BROITMAN, B., COOPER, S. D. & HALPERN, B. S. (2002) A cross-ecosystem comparison of the strength of trophic cascades. *Ecology Letters*, 5, 785-791.
- SIKKEMA, J., DE BONT, J. A. & POOLMAN, B. (1994) Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem*, 269, 8022-8.
- SIKKEMA, J., DE BONT, J. A. & POOLMAN, B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, 59, 201-22.
- SIMON, M. & AZAM, F. (1989) Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 51, 201-213.
- SINGH, B. K., MUNRO, S., REID, E., ORD, B., POTTS, J. M., PATERSON, E. & MILLARD, P. (2006) Investigating microbial community structure in soils by physiological, biochemical and molecular fingerprinting methods. *European Journal of Soil Science*, 57, 72-82.
- SLOAN, W. T., LUNN, M., WOODCOCK, S., HEAD, I. M., NEE, S. & CURTIS, T. P. (2006) Quantifying the roles of immigration and chance in shaping prokaryote community structure. *Environmental Microbiology*, 8, 732-740.
- SMITH, H. L. & WALTMAN, P. (1995) *The Theory of the Chemostat: Dynamics of Microbial Competition*, Cambridge, UK, Cambridge University Press.
- SNELL-CASTRO, R., GODON, J. J., DELGENES, J. P. & DABERT, P. (2005) Characterisation of the microbial diversity in a pig manure storage pit using small subunit rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 52, 229-242.
- SOMMER, U. (1995) An experimental test of the intermediate disturbance hypothesis using cultures of marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 40, 1271-1277.
- STACH, J. E. M., BATHE, S., CLAPP, J. P. & BURNS, R. G. (2001) PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 36, 139-151.
- STEELE, J. H. (2004) Regime shifts in the ocean: reconciling observations and theory. *Progress in Oceanography*, 60, 135-141.
- STEINER, C. F., LONG, Z. T., KRUMINS, J. A. & MORIN, P. J. (2006) Population and community resilience in multitrophic communities. *Ecology*, 87, 996-1007.
- STERNER, R. W., BAJPAI, A. & ADAMS, T. (1997) The enigma of food chain length : Absence of theoretical evidence for dynamic constraint. *Ecology*, 78, 2258-62.
- STOLZ, J. F. (1984) Succession in a microbial mat community: a galian perspective. *Advances in space research : official journal of the Committee on Space Research (COSPAR)*, 4, 203-6.
- STONE, L., GABRIC, A. & BERMAN, T. (1996) Ecosystem resilience, stability, and productivity: Seeking a relationship. *American Naturalist*, 148, 892-903.
- SUAU, A., BONNET, R., SUTREN, M., GODON, J. J., GIBSON, G. R., COLLINS, M. D. & DORE, J. (1999) Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4799-4807.
- SUNDH, I., CARLSSON, H., NORDBERG, A., HANSSON, M. & MATHISEN, B. (2003) Effects of glucose overloading on microbial community structure and biogas production in a laboratory-scale anaerobic digester. *Bioresource Technology*, 89, 237-243.
- SUNNUCKS, P., WILSON, A. C., BEHEREGARAY, L. B., ZENGER, K., FRENCH, J. & TAYLOR, A. C. (2000) SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology*, 9, 1699-710.
- SUZUKI, M. T. & GIOVANNONI, S. J. (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 625-630.
- THINGSTAD, T. F. & LIGNELL, R. (1997) Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand. *Aquatic Microbial Ecology*, 13, 19-27.
- THINGSTAD, T. F., ZWEIFEL, U. L. & RASSOULZADEGAN, F. (1998) P limitation of heterotrophic bacteria and phytoplankton in the northwest Mediterranean. *Limnology and Oceanography*, 43, 88-94.

- THOMPSON, J. R., MARCELINO, L. A. & POLZ, M. F. (2002) Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'. *Nucleic Acids Research*, 30, 2083-2088.
- TIEDJE, J., FERNANDEZ, A., HASHSHAM, S., DOLLHOPF, S., DAZZO, F., HICKEY, R. & CRIDDLE, C. (2001) Stability, persistence and resilience in anaerobic reactors: A community unveiled.
- TIEDJE, J. M., ASUMING-BREMPPONG, S., NÜSSLEIN, K., MARSH, T. L. & FLYNN, S. J. (1999) Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology*, 13, 109-122.
- TILMAN, D. & DOWNING, J. A. (1994) Biodiversity and Stability in Grasslands. *Nature*, 367, 363-365.
- TILMAN, D., LEHMAN, C. L. & THOMSON, K. T. (1997) Plant diversity and ecosystem productivity: Theoretical considerations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94, 1857-1861.
- TOBOR-KAPLON, M. A., BLOEM, J. & DE RUITER, P. C. (2006a) Functional stability of microbial communities from long-term stressed soils to additional disturbance. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 1993-1999.
- TOBOR-KAPLON, M. A., BLOEM, J., ROMKENS, P. & DE RUITER, P. C. (2005) Functional stability of microbial communities in contaminated soils. *Oikos*, 111, 119-129.
- TOBOR-KAPLON, M. A., BLOEM, J., ROMKENS, P. & DE RUITER, P. C. (2006b) Functional stability of microbial communities in contaminated soils near a zinc smelter (Budel, The Netherlands). *Ecotoxicology*, 15, 187-197.
- TOWNSEND, C. The intermediate disturbance hypothesis, refugia, and biodiversity in streams.
- TROUSSELLIER, M., COURTIES, C., LEBARON, P. & SERVAIS, P. (1999) Flow cytometric discrimination of bacterial populations in seawater based on SYTO 13 staining of nucleic acids. *FEMS Microbiology Ecology*, 29, 319-330.
- TUOMANEN, E., COZENS, R., TOSCH, W., ZAK, O. & TOMASZ, A. (1986) The rate of killing of *Escherichia coli* by -lactam antibiotics is strictly proportional to growth rate. *Journal of General Microbiology*, 132, 1297-1303.
- UPADHYAY, R. K., IYENGAR, S. R. K. & RAI, V. (2000a) Stability and complexity in ecological systems. *Chaos Solitons & Fractals*, 11, 533-542.
- UPADHYAY, R. K., RAI, V. & IYENGAR, S. R. K. (2000b) How do ecosystems respond to external perturbations? *Chaos Solitons & Fractals*, 11, 1963-1982.
- VADSTEIN, O., OLSEN, L. M., BUSCH, A., ANDERSEN, T. & REINERTSEN, H. R. (2003) Is phosphorus limitation of planktonic heterotrophic bacteria and accumulation of degradable DOC a normal phenomenon in phosphorus-limited systems? A microcosm study. *FEMS Microbiology Ecology*, 46, 307-316.
- VANHAANDEL, A. C. (1994) Influence of the Digested Cod Concentration on the Alkalinity Requirement in Anaerobic Digesters. *Water Science and Technology*, 30, 23-34.
- VAZQUEZ-DOMINGUEZ, E., CASAMAYOR, E. O., CATALA, P. & LEBARON, P. (2005) Different marine heterotrophic nanoflagellates affect differentially the composition of enriched bacterial communities. *Microbial Ecology*, 49, 474-485.
- VENTER, J. C., REMINGTON, K., HEIDELBERG, J. F., HALPERN, A. L., RUSCH, D., EISEN, J. A., WU, D. Y., PAULSEN, I., NELSON, K. E., NELSON, W., FOUTS, D. E., LEVY, S., KNAP, A. H., LOMAS, M. W., NEALSON, K., WHITE, O., PETERSON, J., HOFFMAN, J., PARSONS, R., BADEN-TILLSON, H., PFANNKOCH, C., ROGERS, Y. H. & SMITH, H. O. (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304, 66-74.
- VERGIN, K. L., URBACH, E., STEIN, J. L., DELONG, E. F., LANOIL, B. D. & GIOVANNONI, S. J. (1998) Screening of a fosmid library of marine environmental genomic DNA fragments reveals four clones related to members of the order Planctomycetales. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3075-3078.
- VERHULST, P. (1838) Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement. *Corres. Math. Phys.*, 10, 113-121.
- VIERA DA SILVA, J. (1979) *Introduction à la théorie écologique*.
- VISSER, A., GAO, Y. & LETTINGA, G. (1993a) Effects of Ph on Methanogenesis and Sulfate Reduction in Thermophilic (55-Degrees-C) Uasb Reactors. *Bioresource Technology*, 44, 113-121.
- VISSER, A., GAO, Y. & LETTINGA, G. (1993b) Effects of Short-Term Temperature Increases on the Mesophilic Anaerobic Breakdown of Sulfate Containing Synthetic Waste-Water. *Water Research*, 27, 541-550.
- VOLKERS, R. J. M., DE JONG, A. L., HULST, A. G., VAN BAAR, B. L. M., DE BONT, J. A. M. & WERY, J. (2006) Chemostat-based proteomic analysis of toluene-affected *Pseudomonas putida* S12. *Environmental Microbiology*, 8, 1674-1679.

- VOLKOV, I., BANAVAR, J. R., HUBBELL, S. P. & MARITAN, A. (2003) Neutral theory and relative species abundance in ecology. *Nature*, 424, 1035-7.
- WAGNER, M. & LOY, A. (2002) Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 218-227.
- WALSH, D. A., BAPTESTE, E., KAMEKURA, M. & DOOLITTLE, W. F. (2004) Evolution of the RNA polymerase B' subunit gene (*rpoB'*) in Halobacteriales: a complementary molecular marker to the SSU rRNA gene. *Molecular Biology and Evolution*, 21, 2340-2351.
- WAWER, C., JETTEN, M. S. M. & MUYZER, G. (1997) Genetic diversity and expression of the [NiFe] hydrogenase large-subunit gene of *Desulfovibrio* spp. in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4360-4369.
- WAWRIK, B., KERKHOF, L., KUKOR, J. & ZYLSTRA, G. (2005) Effect of Different Carbon Sources on Community Composition of Bacterial Enrichments from Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 6776-6783.
- WEINBAUER, M. G., CHRISTEN, R. & HOFLE, M. G. (2006) The response of Vibrio- and Rhodobacter-related populations of the NW Mediterranean Sea to additions of dissolved organic matter, phages, or dilution. *Microbial Ecology*, 51, 336-344.
- WEINBAUER, M. G., FRITZ, I., WENDEROTH, D. F. & HOFLE, M. G. (2002) Simultaneous Extraction from Bacterioplankton of Total RNA and DNA Suitable for Quantitative Structure and Function Analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1082-1087.
- WEINBAUER, M. G. & RASSOULZADEGAN, F. (2004) Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environmental Microbiology*, 6, 1-11.
- WERTZ, S., DEGRANGE, V., PROSSER, J. I., POLY, F., COMMEAUX, C., FREITAG, T., GUILLAUMAUD, N. & LE ROUX, X. (2006) Maintenance of soil functioning following erosion of microbial diversity. *Environmental Microbiology*, 8, 2162-2169.
- WHITAKER, R. J. & BANFIELD, J. F. (2006) Population genomics in natural microbial communities. *Trends in Ecology & Evolution*, 21, 508-516.
- WILSON, C. J., BRAIN, R. A., SANDERSON, H., JOHNSON, D. J., BESTARI, K. T., SIBLEY, P. K. & SOLOMON, K. R. (2004) Structural and functional responses of plankton to a mixture of four tetracyclines in aquatic microcosms. *Environmental Science and Technology*, 38, 6430-6439.
- WILSON, E. O. (Ed.) (1988) *Biodiversity*.
- WINTER, C., SMIT, A., HERNDL, G. J. & WEINBAUER, M. G. (2004) Impact of virioplankton on archaeal and bacterial community richness as assessed in seawater batch cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 804-13.
- XING, J., CRIDDLE, C. & HICKEY, R. (1997a) Effects of a long-term periodic substrate perturbation on an anaerobic community. *Water Research*, 31, 2195-2204.
- XING, J., CRIDDLE, C. & HICKEY, R. (1997b) Long-term adaptive shifts in anaerobic community structure in response to a sustained cyclic substrate perturbation. *Microbial Ecology*, 33, 50-58.
- XU, C.-L. & LI, Z.-Z. (2002) Stochastic ecosystem resilience and productivity: seeking a relationship. *Ecological Modelling*, 156, 143-152.
- YAMAMOTO, T. & HATTA, G. (2004) Pulsed nutrient supply as a factor inducing phytoplankton diversity. *Ecological Modelling*, 171, 247-270.
- ZEHR, J. P., MELLON, M., BRAUN, S., LITAKER, W., STEPPE, T. & PAERL, H. W. (1995) Diversity of Heterotrophic Nitrogen-Fixation Genes in a Marine Cyanobacterial Mat. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2527-2532.
- ZEIKUS, G. (1980) Microbial populations in digesters. IN STAFFORD, WHEATLEY & HUGHES (Eds.) *Anaerobic digestion*. Londres, Applied Science.
- ZHANG, Q.-G. & ZHANG, D.-Y. (2006) Species richness destabilizes ecosystem functioning in experimental aquatic microcosms. *Oikos*, 112, 218-226.
- ZHOU, J. Z. & THOMPSON, D. K. (2002) Challenges in applying microarrays to environmental studies. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 204-207.
- ZHOU, J. Z., XIA, B. C., TREVES, D. S., WU, L. Y., MARSH, T. L., O'NEILL, R. V., PALUMBO, A. V. & TIEDJE, J. M. (2002) Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 326-334.
- ZOHARY, T., HERUT, B., KROM, M. D., MANTOURA, R. F. C., PITTA, P., PSARRA, S., RASSOULZADEGAN, F., STAMBLER, N., TANAKA, T., THINGSTAD, T. F. & WOODWARD, E. M. S. (2005) P-limited bacteria but N and P co-limited phytoplankton in the Eastern Mediterranean - a microcosm experiment. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography*, 52, 3011-3023.

ZUMSTEIN, E., MOLETTA, R. & GODON, J. J. (2000) Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology*, 2, 69-78.

## **ANNEXES**

<b><u>ANNEXE 1 : PROTOCOLE D'ISOLEMENT D'UN PHAGE D'UNE BACTERIE D'INTERET.....</u></b>	<b><u>200</u></b>
V.4.1. INTRODUCTION	
V.4.2. ARTICLE: EFFICIENT METHOD TO ISOLATE AND PURIFY BACTERIOPHAGES IN AQUATIC SYSTEMS	
V.4.3. CONCLUSION	
<b><u>ANNEXE 2 : CONSEQUENCE DE LA CHARGE D'UN VIRUS ET DE SON HOTE BACTERIEN SUR LEUR RENCONTRE.....</u></b>	<b><u>213</u></b>
V.5.1. MESURE DE LA CHARGE D'UNE BACTÉRIE EN ÉVALUANT SON DÉPLACEMENT DANS UN CHAMP ÉLECTRIQUE	
V.5.2. MESURE DU POTENTIEL ZETA D'UN VIRUS PAR DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE	
V.5.3. INTERPRETATION DES POTENTIELS DE BACTERIES ET DE VIRUS EN TERMES DE PROBABILITE DE RENCONTRE	
<b><u>ANNEXE 3 : SUIVI DE PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX SUR LE LITTORAL ET AU LARGE (F.LANTOINE).....</u></b>	<b><u>216</u></b>
<b><u>ANNEXE 4 : MATURATION D'UN SYSTEME « R » VERS UN SYSTEME « K ».....</u></b>	<b><u>222</u></b>
<b><u>ANNEXE 5 : EQUATIONS DU MODELE NEUTRE.....</u></b>	<b><u>223</u></b>
<b><u>ANNEXE 6 : PUBLICATION CORRESPONDAND AUX SIMULATIONs PRESENTEES AU CHAPITRE II.....</u></b>	<b><u>225</u></b>
<b><u>ANNEXE 7 : AMORCES UTILISEES POUR LA SSCP.....</u></b>	<b><u>237</u></b>
<b><u>ANNEXE 8: SAFUM V4.3 MANUAL.....</u></b>	<b><u>238</u></b>

## **Annexe 1 : Protocole d'isolement d'un phage d'une bactérie d'intérêt**

### **V.3.9. Introduction**

Dans le chapitre III nous avons vu qu'*Alteromonas* joue un rôle majeur dans la résilience. Nous avons également vu que la régulation virale était peut-être activée lorsqu'*Alteromonas* devient très abondante après un choc. Pour explorer cette piste, nous avons mis au point un protocole qui permet d'isoler un virus lytique infectant une souche marine d'intérêt.

Ce protocole repose sur le principe de « killing the winner » : des bactéries marines d'intérêt sont mises dans des conditions de lyse virale. Lorsque la lyse virale a lieu, il devient aisé d'isoler le virus lytique par plage de lyse.

### **V.3.10. Article: Efficient method to isolate and purify bacteriophages in aquatic systems.**

Olivier Zemb, Laurent Urios, Clemence Coetsier, Philippe Lebaron

Université Pierre et Marie Curie-Paris6, Paris, F-75005 France; Institut National des Sciences de l'Univers (INSU) CNRS, UMR7621, BP 44, BANYULS-SUR-MER, F-66650 FRANCE

**Running title:** virus amplification protocol

**Submitted to:** Letters in Applied Microbiology

**Corresponding author:** Philippe Lebaron

Tel: (33) 4 68 88 73 53 (outside France)

FAX: (33) 4 68 88 73 95 (outside France)

Email: lebaron@obs-Banyuls.fr

#### **ABSTRACT**

**Aim:** To isolate lytic phages of ecologically interesting heterotrophic bacterial strains from an aquatic environment.

**Methods and Results:** Bacteria-free seawater samples containing natural viroplankton assemblages were inoculated with a single bacterial host of interest in a nutrient-enriched (peptone, Fe(III) and yeast extract) seawater suspension. These conditions provoked the replication of only those virus(es) susceptible to infect the added host. After incubation, bacteriophages were isolated (plaque-forming units method); the final suspensions contained from  $10^5$  to  $10^{10}$  infectious virus particles per ml of seawater. Fifteen bacteriophages were isolated for 12 hosts, including strains isolated concomitantly and strains isolated from geographically separate waters. For example, a

phage was isolated from the Mediterranean that infects a host originating from the Mid-Pacific Ocean. Only two of the hosts tested were infected by more than one bacteriophage.

**Conclusions:** Rapid isolation of lytic phages is possible as long as one specific, infectious virus particle is present for the added host strain in the water sample.

**Significance and Impact of the Study:** The 'killing the winner' theory of host-phage interactions lead to the development of an efficient protocol for phage detection and isolation that is well-suited for aquatic viral ecology studies, including large-scale geographic surveys of viral populations.

**Keywords:** Phage isolation, lytic, protocol, aquatic ecosystem, bacteria

## **INTRODUCTION**

Viruses are now considered important participants in the functioning and regulation of the structure of aquatic microbial food webs (for review, see Wommack *et al.*, 1995) and are a major cause of mortality for bacteria, cyanobacteria and protists. In aquatic ecosystems, viruses are thought to play a key role regulating patterns of bacterial diversity, because no particular bacterial species can dominate a community without also increasing its chances of being infected and "killed" by its specific virus (Thingstad and Lignell, 1997). After viral infection and lysis of the host cell, the released cellular debris contributes to the pool of dissolved organic matter in waters and is available for bacterial respiration and production (Fuhrman, 1999). However, there is little experimental evidence about the viral control of bacterial species communities' compositions, in part because understanding the mechanisms of this competition requires identifying virus-host models for laboratory investigations, and thus also having appropriate and feasible methods for the isolation and concentration of viruses specific to the bacterial strains of interest.

Most existing methods for isolating phage-host systems from water samples (Suttle *et al.*, 1991; Jiang *et al.*, 1998; Alonso *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2003) have two main steps: first, virus particles are concentrated from a suspension (using for example, tangential flow filtration either alone or in combination with ultracentrifugation), and then in a second step, particular phages are identified by the plaque-forming units method. We have had unsatisfactory results using these conventional methods to isolate sufficient quantities of viruses from seawater samples for subsequent characterization and study. Even when we had concentration factors of around 100 in our suspensions of virus-like particles, we found lysis plaques only occasionally despite testing numerous bacterial strains.

An interesting and alternative approach to isolating and identifying phage-host systems was described by Moebus (1980; 1992). In these studies, nutrients were added to untreated seawater samples which were then incubated, facilitating the growth of any phage-host systems present. In principle, this approach increases concentrations of both host and phage by facilitating their growth. Phage and host are separated using conventional centrifugation and filtration, and phage-host systems are identified by culturing techniques (Moebus, 1980). This methodology, based on extensive

cross-testing between phages and bacteria strains cultured from the same water sample, is labor intensive and the low phage yields were impractical for our studies of phage-host systems.

However, the approach described in Moebus (1980) along with a more recent experiment (Hennes *et al.*, 1995) have suggested an intriguing solution to the problem of obtaining large quantities of high quality viral isolates. Hennes *et al.* (1995) observed that the addition of a given bacterial species to natural seawater caused an important increase in the concentration of a virus that was specific to the added bacteria, while studying the function of natural viroplankton in microbial community structures. These two studies suggested to us that addition of a bacterial host to natural water samples would be a novel way to concentrate host-specific viruses. Based on this idea, we have developed and tested a new methodology for concentrating single, strain-specific viruses from natural seawater samples, even when the virus of interest is present at very low concentrations.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Sample collection and isolation of bacterial strains**

The new protocol (described in the next section) was tested on four seawater samples collected in the North Western Mediterranean Sea at the SOLA station (monitoring station of Laboratoire Arago) located in the Bay of Banyuls-sur-Mer (42° 31' N, 03° 11' E) from July 2004 to August 2006. One additional water sample was collected in the Mediterranean coastal lagoon of Leucate, France.

Host bacteria strains were selected to provide a reasonable diversity of marine bacteria for testing the protocol. All the bacteria strains used successfully and their origins are listed in Table 1. Strain OOB 395 was isolated from a surface water sample collected in an oligotrophic zone of the Mid-Pacific Ocean (26° 03.462 S, 114° 01.599 W). Two environmental strains were part of the reference collection (Moebus, 1992; Wichels *et al.*, 1998; Agogue *et al.*, 2005) of the Laboratoire Arago in Banyuls-sur-Mer. Additional strains were isolated from SOLA station and Leucate Lagoon water samples by plating either 100 µl from each sample or from serial dilutions of samples in filter-sterilized seawater onto triplicate seawater agar (SWA) plates. After aerobic incubation at 25 °C for two weeks, isolates were selected according to both colony morphology and color to increase the chances of picking different species (Lebaron *et al.*, 1998). Each selected isolate was purified by two successive subcultures.

A majority of the bacterial isolates having lytic phages in the tested water (Table 1) were sequenced on the 16S rDNA gene according to a slightly modified version of the method described in Agogue *et al.* (2005). PCR amplification of the 16S rRNA gene used two primers (128 nM of each): SAdir (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAGA-3'; *Escherichia coli* 16S rRNA gene positions 8 to 27 [forward primer]) and S17 Rev (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3'; *E. coli* 16S rRNA gene positions 1491 to 1508 [reverse primer]). PCR cycles settings were: initial denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, primer annealing at 50 °C for 1.5 min, and elongation at 72 °C for 2 min. The final elongation step was 10 min at 72 °C.

Bacterial suspensions of each isolate used in the virus amplification experiments (described below in section 2.2) were prepared in seawater broth (SWB). SWA and SWB were both prepared as

described in Moebus (1980; SWA: 5 g peptone; 1 g yeast extract; 0.1 g Fe PO<sub>4</sub> per liter of seawater mixture (75% aged sea water + 25% distilled water), 1.5% agar content; for SWB: see footnote for Table 2). Individual bacterial suspensions were created by inoculating one of the isolated bacterial strains in SWB and incubating at 25 °C with continuous shaking for at least 12 h to obtain a cellular suspension of about 10<sup>8</sup> cells ml<sup>-1</sup>. Virus-free seawater was prepared by autoclaving at 110 °C for 15 minutes and used for dilutions of the plaque forming units (PFU).

#### **Concentration of viruses by the Host Addition Virus Amplification Protocol (HAVAP)**

The tested method was designed to concentrate one particular phage by stimulating phage production via lysis, removing the bacterioplankton host in the process. All manipulations were done under sterile conditions. First, two liters of SOLA station seawater were pre-filtered through a 3 µm polycarbonate Nucleopore membrane (Whatman, Dassel, Germany) and then filtered through a 0.2 µm Sterivex membrane to obtain a bacteria-free seawater. Both filters were pre-saturated with sterile beef extract (1%) to reduce the adsorption of viruses onto the filters. After removal of the bacterioplankton, the isolated bacterial host was added. Each previously prepared bacterial suspension (200 ml in SWB) was centrifuged under sterile conditions, the cells resuspended in 200 ml of fresh SWB, and then mixed with 600 ml of the bacteria-free seawater.

Next, an incubation period allows any potential lytic phage present in the bacteria-free seawater to infect the added bacterial host and replicate. After 60 h of incubation at 25 °C in the dark, 1-2 ml of the suspension were centrifuged (15 min at 13,000g, 4 °C) and the supernatant analyzed for virus-like particles and plaque forming units (PFUs). If desired, the supernatant can be sterilized by an additional filtration with 0.2 µm Millex filters (Millipore Corp.), prior to the PFU tests. This may lead to phage loss because of sorption to the filter material.

The effectiveness of HAVAP was determined by the minimum concentration of virus H71/1 in a SWB suspension that was necessary to generate PFUs.

#### **Purification of phage from lysis products with polyethylene glycol**

When the virus amplification was complete, viruses were separated from the lysis products using a precipitation step with polyethylene glycol (PEG). This method was preferred to lyophilization because it preserves the virulence of the viruses (Yamamoto *et al.*, 1970). The precipitation was done by adding 10 g l<sup>-1</sup> of PEG 8000 or 1 g l<sup>-1</sup> PEG 35,000 to 50 ml of the viral suspension in seawater. After 1 h of incubation at 4 °C, the sample was centrifuged (25 min, 10,000g) and the pellet was resuspended in 50 µl of virus-free seawater (Traore *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2003). This step is required for the clean suspensions used in dynamic light scattering and TEM applications.

#### **Counts of virus-like particles by epifluorescence microscopy**

To quantify the concentration yield, we counted the number of virus-like particles by epifluorescence microscopy in the initial seawater and in the bacterial culture after the virus concentration step was complete for each method. One milliliter samples were fixed with formaldehyde for 10 minutes (final concentration, 2% w/v), then filtered through a 0.02 µm pore-size

Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Anodisc membrane filter (Whatman, Dassel, Germany). A stock solution of SYBR Green I (Molecular Probes Invitrogen, Cergy Pontoise, France) was diluted 1:10 with DMSO. For each new filter, 5 µl of the 10% SYBR Green I working solution was added to a 95 µl drop of sterile water on the bottom of a petri dish. Next, the Anodisc membrane filter was placed on the drop of staining solution for 30 min, in the dark. The membrane filter was mounted on a glass slide and the virus-like particles (VLPs) were counted with an Olympus AX-70 microscope (Noble and Fuhrman, 1998).

#### **Count of infectious phages by Plaque Forming Units (PFU)**

To estimate the concentration yield in terms of infectious particles, we also counted the viruses by PFU assays. Plaque forming units were estimated as described in Wichels *et al.* (1998). Briefly, this method uses two-layer agar plates each containing a firm bottom layer (10 ml) and a soft agar upper layer (3 ml) mixed with 0.5 ml of a bacterial suspension at 10<sup>8</sup> cell ml<sup>-1</sup>. Virus suspensions were serially diluted in virus-free seawater down to 10<sup>-8</sup>. Ten microliters of each diluted sample were dotted onto the upper layer immediately after the agar solidified. Each dilution well was counted in duplicate. PFUs were counted after incubation overnight at 20 °C in the dark. Results are reported in viral particles per ml.

#### **Virus morphology**

The morphology and diversity of viral particles were observed using transmission electron microscopy. A high-titer virus solution (prepared and purified as described in section 2.3) was negatively stained for the viruses according to Raguénès *et al.* (1997). Five microliters of high-titer lysate were allowed to adsorb for 3 min on a 300-mesh formvar carbon copper grid (Delta Microscopies, Labège, France) and then stained with 5 µl of 2% (w/v)-uranyl acetate for 40 seconds. The grids were air dried before observation. Micrographs were made by transmission electron microscopy (Hitachi 7500) with a beam voltage of 80 kV. Phage size was estimated by determining the mean size of 30 particles of each phage type.

#### **Quality of the amplified phages for physical analyses**

In addition to the TEM and PFU analyses, we also measured the physical homogeneity of the virus particles produced during the HAVAP incubation, because an important goal of our protocol is to produce homogeneous populations of phages for further studies. The size distribution and the zeta potential of virus particles produced were measured by dynamic light scattering using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). Measurements were made in duplicate on four preparations of H71/1 and VOZ1 as described in section 2.3. The measurements were done at 15 °C in sterile seawater and in seawater diluted 10-fold (also at 15 °C) for the size and the zeta potential, respectively. Both of these estimates were calculated using a viscosity of 1.1442 cP.

## **RESULTS**

The bacterial host was selected in advance, cultured in isolation, and then added to a bacteria-free water sample. This approach, which we have abbreviated HAVAP, was used to isolate twelve

new phage-host systems (Table 1), producing suspensions that contain between  $10^5$  and up to  $10^{10}$  viruses-like particles  $\text{ml}^{-1}$  depending on the host-phage system.

**Table 1.** Bacterial host strains and their origins, and the amplified viruses found after HAVAP testing. A total of 38 strains were tested.

Host strain	Similarity value	Strain origin**	Amplified virus	Isolation date (dy/mo/yr)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.		Lab	H71/1 6-42c	Wichels <i>et al.</i> , 1998
<i>Alteromonas</i> sp.		Lab	VAM	19/07/04
<i>Vibrio splendidus</i>	97 %	SOLA	VOZ1a VOZ1b	14/12/04
Unidentified bacteria***	-	SOLA	VOZ5	14/12/04
<i>Vibrio campbellii</i>	98%	SOLA	VZO1	13/07/05
<i>Listonella pelagia</i>	98%	SOLA	VZO2	13/07/05
<i>Pseudoalteromonas piscidia</i>	100%	SOLA	VZO4	13/07/05
<i>Vibrio hepatarius</i>	97%	SOLA	VZO5	13/07/05
<i>Vibrio hepatarius</i>	99%	SOLA	VZO6	13/07/05
<i>Vibrio lentus</i>	99%	Leucate	VLL38	22/11/05
Slow Growing 3***	-	SOLA	VSG3	12/08/06
Col1J6***	-	SOLA	Vcol1J6	12/08/06
<i>Tenacibaculum cellulophagum</i> (OOB395)	98%	OOB(Pacific)	Vbiosli/33	12/08/06

\* Bacterial host targeted by virus during amplification step.

\*\* Origin of strain isolated. Lab = Reference collections at Laboratory Arago, France; SOLA= isolated from seawater at SOLA station, Banyuls-sur-Mer, France; Leucate = isolated from Leucate Lagoon, France. Lab(Pacific) = collection at Laboratory Arago, isolated from BIOSOPE Project, mid Pacific Ocean

\*\*\* This strain was not identified.

**Table 2.** Comparison between bacterial strain isolation and bacteriophage enrichment procedures used in HAVAP (this study) and Moebus (1980). In HAVAP, the viroplankton is incubated with one selected bacterial strain, resulting in a relatively pure suspension of replicated virus particles (after step 11). With the Moebus protocol, all the bacteria and bacteriophages present in a water sample are incubated together. Both require additional steps of isolation, purification and verification after step 15 (see this text and Moebus 1980).

Step	HAVAP	Moebus
1	Collect 1 liter of seawater, store at 4 °C until step 8	Collect 5 liters of seawater. Split sample for steps 2 and 8
2	--	Concentrate bacteria from one sample split by filtering at 0.2 µm and collecting retentate
3	Isolate bacterial strain from seawater sampled, and/or culture strains-of-interest from laboratory collections on SWA	Isolate bacterial strains on SWA from re-suspended retentate in step 2
4	Prepare bacterial suspension by inoculating 200 mL of SWB <sup>a</sup> with the selected bacterial strain	Maintain isolated strain cultures on SWA until step 15
5	Incubate under agitation 12 h at 25 °C, obtaining a culture in exponential growth	--
6	Centrifuge culture at 6000g, 5 min, to pellet the cells	--
7	Resuspend cells in 200 mL of fresh SWB	--
8	Saturate 3 µm and 0.2 µm filters with 400 mL seawater and 1 mL sterile beef extract, discard filtrate	--
9	Filter 600 mL of the collected seawater with treated filters. Filtrate contains viroplankton.	Create 3 splits of unfiltered seawater from step 1
10	Mix viroplankton (step 9) and bacterial host suspension (step 7) in incubation bottle.	Add nutrients corresponding to SWB/5 <sup>b</sup> immediately to subsample 1, and after 1 d and 2 d to each remaining subsample, respectively.
11	Incubate for 60 h or up to 3 days, agitated at 25 °C, in the dark <sup>c</sup> .	Total incubation time is 3 d for each subsample. No agitation, 20 to 26 °C.
12	Collect 1-2 mL from incubation bottle	Collect 10 mL aliquots of each subsample at 1 d, 2 d, and 3 d after addition of nutrients
13	Centrifuge at 13000g, 4 °C for 15 min	Centrifuge at 2000 rpm for 20 min
14	<i>Optional step:</i> filter supernatant at 0.2 µm to remove any remaining bacteria, but phage loss will be important	Filter supernatant at 0.15 µm using filters pre-washed with sterile beef extract
15	Perform PFU test on the selected bacterial strain, using supernatant	Perform PFU test on the isolated bacterial strains (step 4) using supernatant

<sup>a</sup> SWB in this text is equivalent to SWB/5 in Moebus.

<sup>b</sup> SWB/5 ("seawater bouillon - reduced strength"), contains 1 g peptone, 0.2 g yeast extract, and 0.1 g Fe PO<sub>4</sub> per liter of seawater mixture (75% aged seawater + 25% distilled water)

<sup>c</sup> Recommended conditions can be optimized to host strain

Phages for a variety of different host strains and conditions were successfully isolated, including some fast growing *Vibrio* sp. but also two bacterial strains that needed a week to form visible colonies on MB Agar (Table 1, "Slow Growing 3" and "Col1J6"). Interestingly, two different viral morphotypes may develop during the same amplification, and can be isolated simultaneously (Fig. 1 Table 1: *Vibrio splendidus*). Finally, a phage from Mediterranean waters which infects a CFB group strain previously isolated from the Mid- Pacific Ocean was isolated.

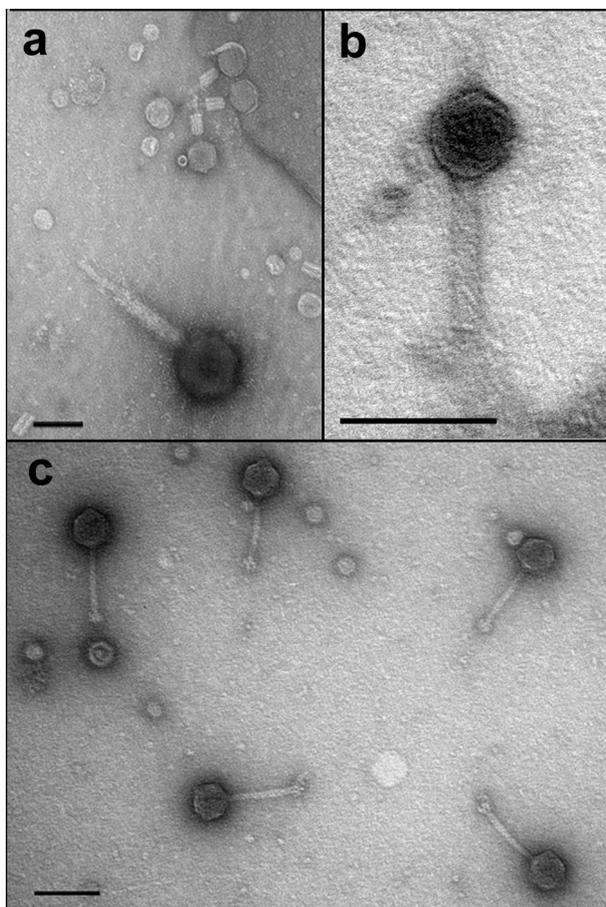


Figure 1: Putative virus observed by TEM in samples treated by HAVAP and amplified by  $10^6$  times. The PEG purified virus particles were stained with uranyl-acetate. The structure shown repeats many times in the preparation. Electron beam voltage was 80 kV. a) Mix of two morphotypes of VOZ1 infecting viruses after amplification (image post-processed to increase contrast) lengths:  $425 \text{ nm} \pm 22 \text{ nm}$  and  $148 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ , b) morphotype of Vbiosli/33 length:  $149 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$ , c) morphotype of VSG3 length:  $177 \text{ nm} \pm 6 \text{ nm}$ .

Lytic bacteriophages producing PFUs were isolated for 12 out of 38 strains tested with the virioplankton assemblage present in our water samples. Without any amplification step, 100  $\mu\text{l}$  of seawater did not generate PFUs for any of the 38 strains tested. Thus we estimate that the initial water samples had less than 10 phages per ml (detection limit of 10 phages  $\text{ml}^{-1}$ , assuming 100% recovery), and that viruses infecting the bacterial host are concentrated by  $10^6$  times.

HAVAP was tested in five replicates with *Tenacibaculum cellulophagum*; phages were present in similar concentrations in each replicate ( $2.78 \pm 1.2 \cdot 10^{10}$  viruses  $\text{mL}^{-1}$  after 50 hours of incubation), given the slight differences between the amplification curves (Fig. 2). The infectiousness of these particles was confirmed by comparing the results of growth experiments with and without added previously amplified viral particles (Fig. 3). The infected bacterial strain released infectious phage and the bacterial host showed some resistance.

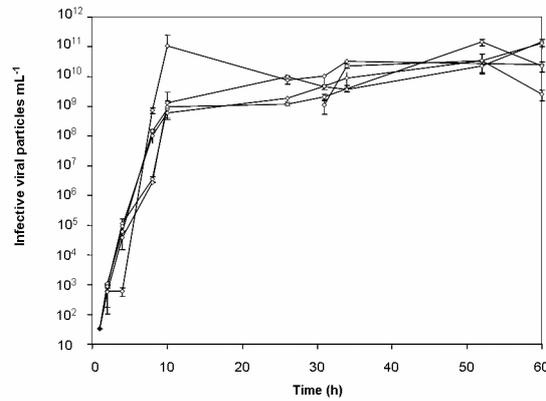


Figure 2: Plaque forming units (PFU) during the specific amplification (step 11, Table 2) of host strain OOB 395.

The first point (●) is the estimated threshold of detection by plating 30  $\mu\text{L}$  of suspension. The amplification is reproducible, even though the seawater was stored at 4 °C for several weeks. Up to  $10^{10}$  lytic viruses are produced after 60 h of incubation and the loss by degradation is minimal.

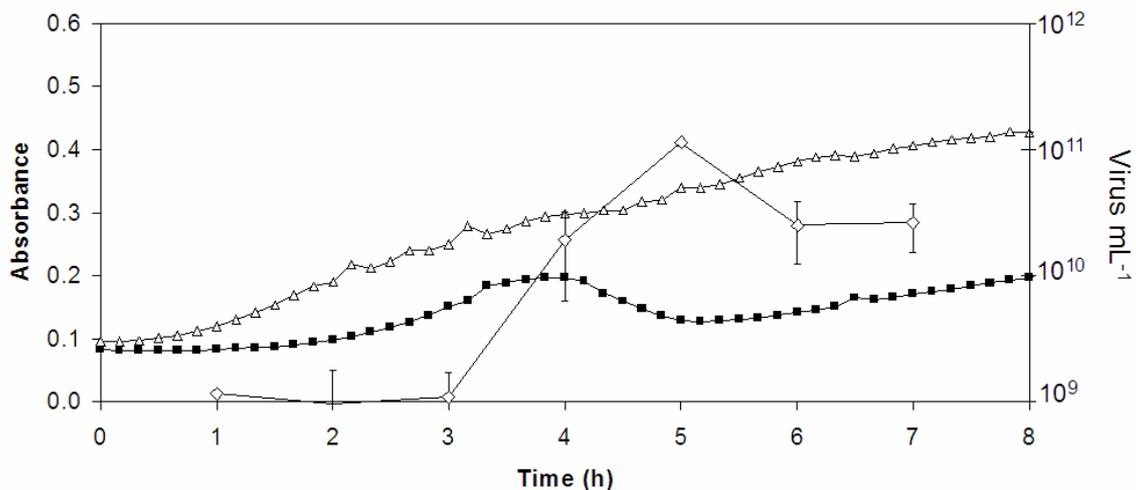


Figure 3 : Growth followed by monitoring OD<sub>490</sub> for 8h of strain OOB 395 with (■) and without (▲) the viral particles (Vbiosli/33) that were isolated previously by HAVAP.

The growth experiment was completed in SWB, in the dark, at 25 °C, briefly agitated every 10 minutes. Infected culture has lower growth rate. Some cells were lysed after 4 hours.

Finally, the suspensions produced were of a high enough quality and concentration that the physical parameters of the viral particles could be measured in suspension. For example, rapid size analysis by dynamic light scattering confirmed the TEM observations and the low concentration of cellular waste (data not shown). It was also possible to measure the zeta potentials of VO1 and H71/1 ( $-20\text{mV} \pm 1.6$  and  $-19\text{mV} \pm 1.1$ , respectively) on aliquots of the suspensions.

## **DISCUSSION**

The use of a single host strain (Table 2, steps 7 and 10) eliminates interspecific competition between bacterial strains during incubation, and constitutes a major departure from the Moebus (1980) and Hennes *et al.* (1995) protocols which both used unfiltered water for incubations. In particular, the Moebus (1980) protocol is well-adapted if the phage and host are present and competitive; it is unlikely that this protocol isolates viruses of either rare bacterial species, or of bacteria in poor physiological condition. Using bacterial assemblages favors those bacteria in good physiological condition and able to thrive under incubation conditions, and thus becoming more susceptible to lytic infection (Thingstad and Lignell, 1997). Therefore, it is unlikely that viruses of strains which needed a week to form visible colonies on MB Agar could be isolated with the protocol of Moebus (1980).

In another experiment, Hennes (1995) reported that a virus population increased from undetectable ( $< 1 \text{ ml}^{-1}$ ) to ca.  $10^7$  viruses  $\text{ml}^{-1}$  in natural seawater and to ca.  $10^8$  viruses  $\text{ml}^{-1}$  in nutrient-enriched seawater, 48 hours after adding a bacterial host (PWH3a) to natural seawater (with the bacterioplankton). HAVAP's higher yields might be partly explained by the specificity of the amplification, because in contrast with Hennes *et al.* (1995), nutrients are assimilated by the sole strain of interest present. Thus, in HAVAP, if the strain is infected by a phage in the sample, then all the nutrients are potentially available for the unique host, and therefore to phage production.

The high yield of HAVAP implies a low detection limit for the protocol. Furthermore, because HAVAP uses a single host during incubation, incubation time and media composition could be optimized to specific host physiological requirements, as necessary. Surprisingly we have observed experimental failures for some of the bacterial host when a ten times excess of nutrients were added.

The low detection limit of HAVAP makes it possible to investigate questions about the co-occurrence of rare hosts and phages in aquatic systems. For example, despite earlier suggestions that isolation of phage-host systems would work best when the host strains and phages were isolated from the same water sample (Moebus 1980), we have isolated a phage infecting a *Tenacibaculum sp.* (*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* group) from the Pacific Ocean using HAVAP on water samples from the Mediterranean Sea.

In comparison with our methodology, approaches that use a pre-concentration step for viral particles from water samples followed by an infection assay on plates pre-inoculated with the bacterial host often produced unsatisfactory results (data not shown). Reported concentration factors for VLPs range from 20 to 1000 using conventional methods of filtration and centrifugation (Paul *et al.*, 1991; Suttle *et al.*, 1991; Wommack *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 1998). Even after ultrafiltration and

ultracentrifugation, the virus of interest is not necessarily present at high enough concentrations in the viral concentrate, and the forces generated in tangential flow filtration may damage phage tails reducing their infectiousness (Weinbauer, 2004), rendering the viruses unsuitable for further isolations. So, while these methods have apparently similar yields (e.g.  $5 \times 10^8$  in Wommack *et al.*, 1995) and are quantitative, they are not selective enough to be efficient for detailed studies of host-phage systems.

In contrast, samples treated by HAVAP can selectively produce up to  $10^{10}$  viruses-like particles  $\text{ml}^{-1}$  with minimal usage of centrifugation (see comparison in Table 2). The zeta potential values of our VO1 and H71/1 were very similar to the zeta potential value of virus PWH3A-P1 of  $-20$  mV at pH 8 (Daughney *et al.*, 2004). This negative zeta potential implies a repulsion from negatively charged bacterial membranes which might, in turn, affect the encounter rate between the phage and host.

In conclusion, HAVAP was designed to circumvent some important disadvantages of existing approaches used for isolating phage-host systems: 1. Interspecific competition between host strains (Moebus, 1980), 2. lack of selectivity and tail damage during pre-concentration of samples leading to high detection limits (Wommack and Colwell, 2000), and 3. long sample preparation times associated with tangential flow and ultra- filtration techniques. HAVAP is a simple, reliable method allowing the preparation of high-concentration and clean virus suspensions. With this method we were able to amplify the virus of the added host from undetectable levels up to concentrations high enough to allow the selected virus to become easily detectable by classical plaque assays. When compared to other protocols, HAVAP provides technical advantages that are significant for questions addressed in viral ecology.

#### **Acknowledgements**

We extend our thanks to Muriel Bourrain and Laurent Intertaglia for the sequencing of the strains and to the captain and crew of the RV *Nereis II* for their contributions. We thank Jennifer Guarini for providing very helpful comments on the manuscript and for revising.

## References

- Agogue, H., Casamayor, E.O., Bourrain, M., Obernosterer, I., Joux, F., Herndl, G.J. and Lebaron, P. (2005) A survey on bacteria inhabiting the sea surface microlayer of coastal ecosystems. *FEMS Microbiol Ecol* **54**, 269-280.
- Alonso, M.C., Rodriguez, J. and Borrego, J.J. (1999) Enumeration and isolation of viral particles from oligotrophic marine environments by tangential flow filtration. *Int Microbiol* **2**, 227-232.
- Daughney, C.J., Chatellier, X., Chan, A., Kenward, P., Fortin, D., Suttle, C.A. and Fowle, D.A. (2004) Adsorption and precipitation of iron from seawater on a marine bacteriophage (PWH3A-P1). *Mar Chem* **91**, 101-115.
- Fuhrman, J.A. (1999) Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* **399**, 541-548.
- Hennes, K.P., Suttle, C.A. and Chan, A.M. (1995) Fluorescently labeled virus probes show that natural virus populations can control the structure of marine microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3623-3627.
- Jiang, S., Fu, W., Chu, W. and Fuhrman, J.A. (2003) The vertical distribution and diversity of marine bacteriophage at a station off Southern California. *Microb. Ecol* **45**, 399-410.
- Jiang, S.C., Kellogg, C.A. and Paul, J.H. (1998) Characterization of marine temperate phage-host systems isolated from Mamala Bay, Oahu, Hawaii. *Appl Environ Microbiol* **64**, 535-542.
- Lebaron, P., Ghiglione, J.F., Fajon, C., Batailler, N. and Normand, P. (1998) Phenotypic and genetic diversity within a colony morphotype. *FEMS Microbiol Lett* **160**, 137-143.
- Lee, K.C., Lim, D., Wong, S.M. and Dokland, T. (2003) Purification, crystallization and X-ray analysis of Hibiscus chlorotic ringspot virus. *Acta Crystallogr Sect D-Biol Crystallogr* **59**, 1481-1483.
- Moebus, K. (1980) A method for detection of bacteriophage from ocean water. *Helgol Meeresunters* **34**, 1-14.
- Moebus, K. and Nattkemper, H. (1981). "Bacteriophage sensitivity patterns among bacteria isolated from marine waters." *Helgol Meeresunters* **34**(3): 375-385.
- Moebus, K. (1992) Further Investigations on the Concentration of Marine Bacteriophages in the Water around Helgoland, with Reference to the Phage-Host Systems Encountered. *Helgol Meeresunters* **46**, 275-292.
- Noble, R.T. and Fuhrman, J.A. (1998) Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquat Microb Ecol* **14**, 113-118.
- Paul, J.H., Jiang, S.C. and Rose, J.B. (1991) Concentration of viruses and dissolved DNA from aquatic environments by vortex flow filtration. *Appl Environ Microbiol* **57**, 2197-2204.
- Raguénès, G., Christen, R., Guézennec, J., Pignet, P. and Barbier, G. (1997) *Vibrio diabolicus* sp. nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 989-995.
- Suttle, C.A., Chan, A.M. and Cottrell, M.T. (1991) Use of Ultrafiltration To Isolate Viruses from Seawater Which Are Pathogens of Marine Phytoplankton *Appl Environ Microbiol* **57**, 721-726.

Thingstad, F.T. and Lignell, R. (1997) Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand. *Aquat Microb Ecol* **13**, 19-27.

Traore, O., Arnal, C., Mignotte, B., Maul, A., Laveran, H., Billaudel, S. and Schwartzbrod, L. (1998) Reverse transcriptase PCR detection of astrovirus, hepatitis A virus, and poliovirus in experimentally contaminated mussels: Comparison of several extraction and concentration methods. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3118-3122.

Weinbauer, M.G. (2004) Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev* **28**, 127-181.

Wichels, A., Biel, S.S., Gelderblom, H.R., Brinkhoff, T., Muyzer, G. and Schutt, C. (1998) Bacteriophage diversity in the North Sea. *Appl Environ Microbiol* **64**, 4128-4133.

Wommack, K.E. and Colwell, R.R. (2000) Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 69-114.

Wommack, K.E., Hill, R.T. and Colwell, R.R. (1995) A Simple Method for the Concentration of Viruses from Natural-Water Samples. *J Microbiol Methods* **22**, 57-67.

Yamamoto, K.R., Alberts, B.M., Benzinger, R., Lawhorne, L. and Treiber, G. (1970) Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology* **40**, 734-744.

### **V.3.11. Conclusion**

Nous avons perfectionné un protocole d'isolation de virus. Il est désormais possible de chercher spécifiquement et avec efficacité un virus lytique infectant une souche d'intérêt et de mesurer sa charge de surface. Il est donc maintenant possible de quantifier les forces électrostatiques entre bactéries et virus. C'est ce que nous allons détailler dans l'annexe suivante.

## **V.4. Annexe 2 : Conséquence de la charge d'un virus et de son hôte bactérien sur leur rencontre**

Les océanologues ont constaté un déséquilibre entre la production de bactérioplancton et la prédation par les flagellés de ce plancton. Plusieurs auteurs ont montré l'importance de la régulation virale *in situ* (cf revue de Womack et Colwell, Virioplancton:viruses in Aquatic Ecosystems).

Les virus répondent en partie à cette mortalité inexplicée : Lorsque la probabilité de rencontre entre un virus et sa bactérie hôte est trop forte, le virus peut entrer dans une phase de multiplication active et lyser les bactéries hôtes. Thingstad et Lignell en 1997 ont émis l'hypothèse que cette régulation pourrait « tuer le vainqueur de la compétition naturelle » et de ce fait expliquer la biodiversité bactérienne constatée dans le milieu naturel. Cette hypothèse qualitative a été étayée par des modèles mathématiques.

Un paramètre vital pour ces modèles est la probabilité de rencontre entre un virus et son hôte. Dans les modèles actuels, les virus et les bactéries sont considérés comme des sphères neutres soumises à l'agitation brownienne.

Considérant un certain nombre de faits expérimentaux, nous pensons que les virus sont chargés négativement (rétention sur filtres (borrego et al., 1991, Chang et al., 1981), adsorption sur magnétite). Il est d'autre part admis que les bactéries sont également chargées négativement en surface à cause des composants de la paroi.

La première question que nous posons est donc : Peut-on négliger les répulsions électrostatiques et considérer que la probabilité de rencontre entre un virus et une bactérie est la probabilité de rencontre entre deux sphères neutres ?

Ces forces de répulsion dépendent beaucoup de la salinité du milieu. La deuxième question est que nous posons est donc : ces forces de répulsion varient-elles de manière significative entre l'eau de mer à 36 g/l et une eau de mer « diluée » après une forte pluie (environ 34 g/l) ?

Mesurer les potentiels zêta des virus et des bactéries permet, en utilisant les équations données dans les livres « classiques » de Kruyt, de donner un temps moyen entre rencontre entre un virus de potentiel zêta donné et les bactéries que nous avons mesurées, et qui ne dépendent que de : la viscosité, les deux diamètres, les deux potentiels zêta et les densités de virus et de bactéries en objets/ml.

Ces temps moyens entre rencontres peuvent être fort variables, et pourront être utilement comparés aux constantes de temps de variation connues dans le système : génération de bactéries, probabilité d'infection, ...

### **V.4.1. Mesure de la charge d'une bactérie en évaluant son déplacement dans un champ électrique**

Le zétamètre est un microscope relié à une caméra qui permet de mesurer le mouvement induit par un champ électrique des particules chargées, et ainsi leur charge (potentiel zeta). Il est extrêmement important de placer le champ d'observation dans le plan stationnaire afin d'éviter des

déplacements qui ne sont pas uniquement dus au champ électrique. Ce plan stationnaire (à déterminer au préalable pour la cuve de quartz utilisée) est accessible à l'observation au microscope grâce à une sonde micrométrique. Les différentes bactéries sont cultivées de manière à être dans une phase caractéristique lors de la mesure du potentiel zêta. L'inoculum est une population en culture sur la nuit en SWB. Les différentes souches sont repiquées à 1% à partir des inoculums précédemment décrits. Les cultures sont effectuées à 25°C sous agitation (250 rpm) en SWB (6 heures pour la phase exponentielle, 19 heures pour le début de la phase stationnaire et 36 heures pour la phase stationnaire). Le potentiel zeta a été mesuré dans différents milieux : de l'eau de mer filtrée et stérilisée est préparée, soit sans dilution, soit diluée 10 fois ou 100 fois par de l'eau MilliQ. Les cultures sont centrifugées à 5000g pendant deux minutes et les cellules sont reprises dans l'eau de mer pure ou dans l'eau de mer diluée. Le potentiel zeta est ainsi mesuré dans de l'eau de mer pure, dans l'eau de mer diluée 10 fois et dans de l'eau de mer diluée 100 fois.

Nous avons mesuré le potentiel zeta de trois souches modèles à différents stades de croissance : *Pseudoalteromonas carragenovora* sp H71, *Marinobacter aquaeolei* sp Z7b, *Alteromonas Macleodii*

La charge de surface dépend du pH, de la phase de croissance (exponentielle ou non), et de la force ionique du milieu (données non présentées). Par exemple, pour des bactéries en phase exponentielle, le potentiel zeta est de l'ordre de -20 mV dans l'eau de mer diluée au 10<sup>ième</sup>. Le potentiel zeta de bactéries en phase exponentielle est de l'ordre de -10 mV dans l'eau de mer naturelle.

Dans le milieu naturel, la bactérie est associée à des ions qui sont adsorbés à sa paroi. Cette adsorption suit les lois de l'équilibre chimique. Il est important de souligner que la zetamétrie mesure la "charge nette" de la bactérie complexée à ces contre-ions. La charge théorique ou "dosable" totale de l'ensemble des charges électriques fixes sans la diminution due aux contre-ions fixés à l'interface est appelée charge structurale et ne peut être déterminée que par des expériences de dosages suivies d'extrapolations. Le rapport entre la charge nette ou effective et la charge structurale pour un colloïde quelconque est appelé coefficient de dissociation .

#### **V.4.2. Mesure du potentiel zêta d'un virus par diffusion dynamique de la lumière**

Une technique permet de mesurer le déplacement des virus (qui sont trop petits pour être détectables par le zétamètre précédent). Cette technique repose sur la diffusion dynamique de la lumière (cf. Annexe1). Il a été possible de mesurer un potentiel de -10 mV

### V.4.3. Interprétation des potentiels de bactéries et de virus en termes de probabilité de rencontre

Le fait que les virus et les bactéries soient chargés négativement modifie le potentiel d'un virus approchant d'une bactérie (Figure V.4-1) et par conséquent leur probabilité de rencontre.

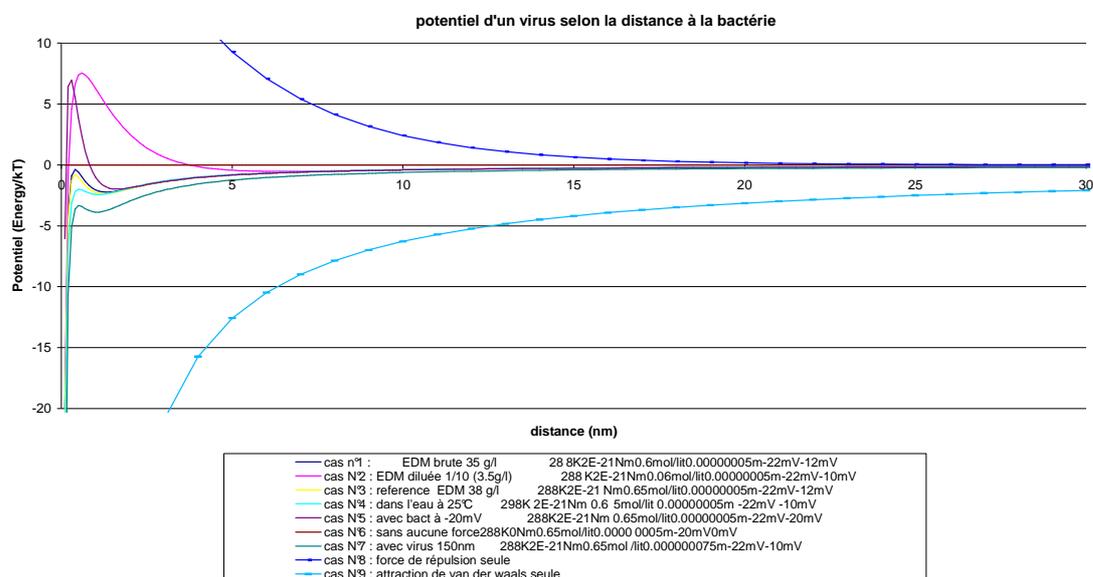


Figure V.4-1 : Potentiel d'un virus en fonction de la distance par rapport à son hôte

Si la salinité conditionne la probabilité de contact entre une bactérie et un phage, les changements de salinité pourraient avoir des répercussions sur l'infection des bactéries. D'après les ordres de grandeur obtenus par ces manipulations préliminaires, il semblerait que d'une manière générale les changements de salinité perçus par les bactéries de la zone littorale de la baie de Banyuls (Figure III.6-1) ne sont pas assez importants pour modifier significativement les probabilités de rencontre. Cependant, le changement de salinité perçu par les bactéries d'eau douce lorsqu'elles passent en milieu marin pourrait influencer sur la probabilité de rencontre entre virus et bactéries.

## V.5. Annexe 3 : Suivi de paramètres environnementaux sur le littoral et au large (F.Lantoine)

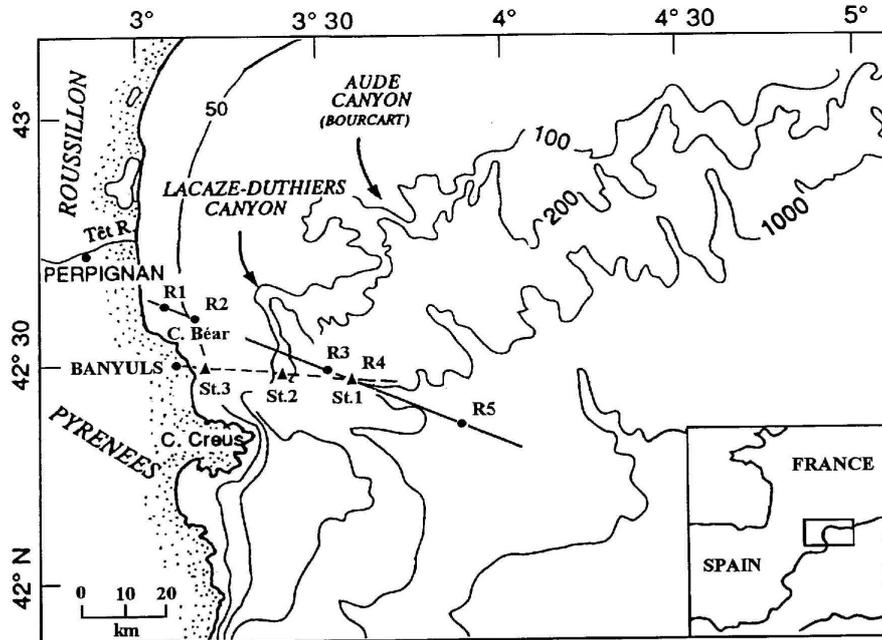
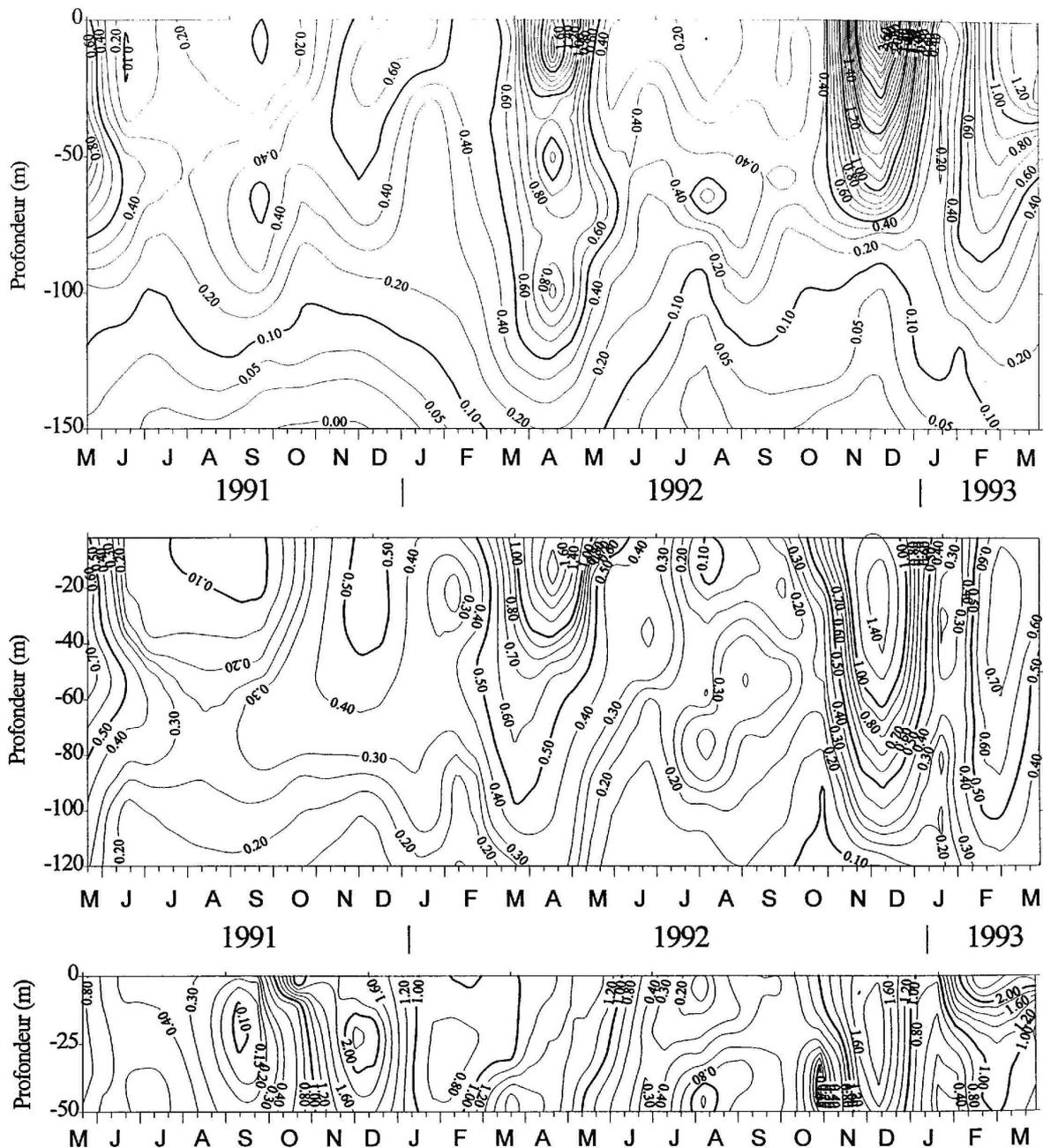


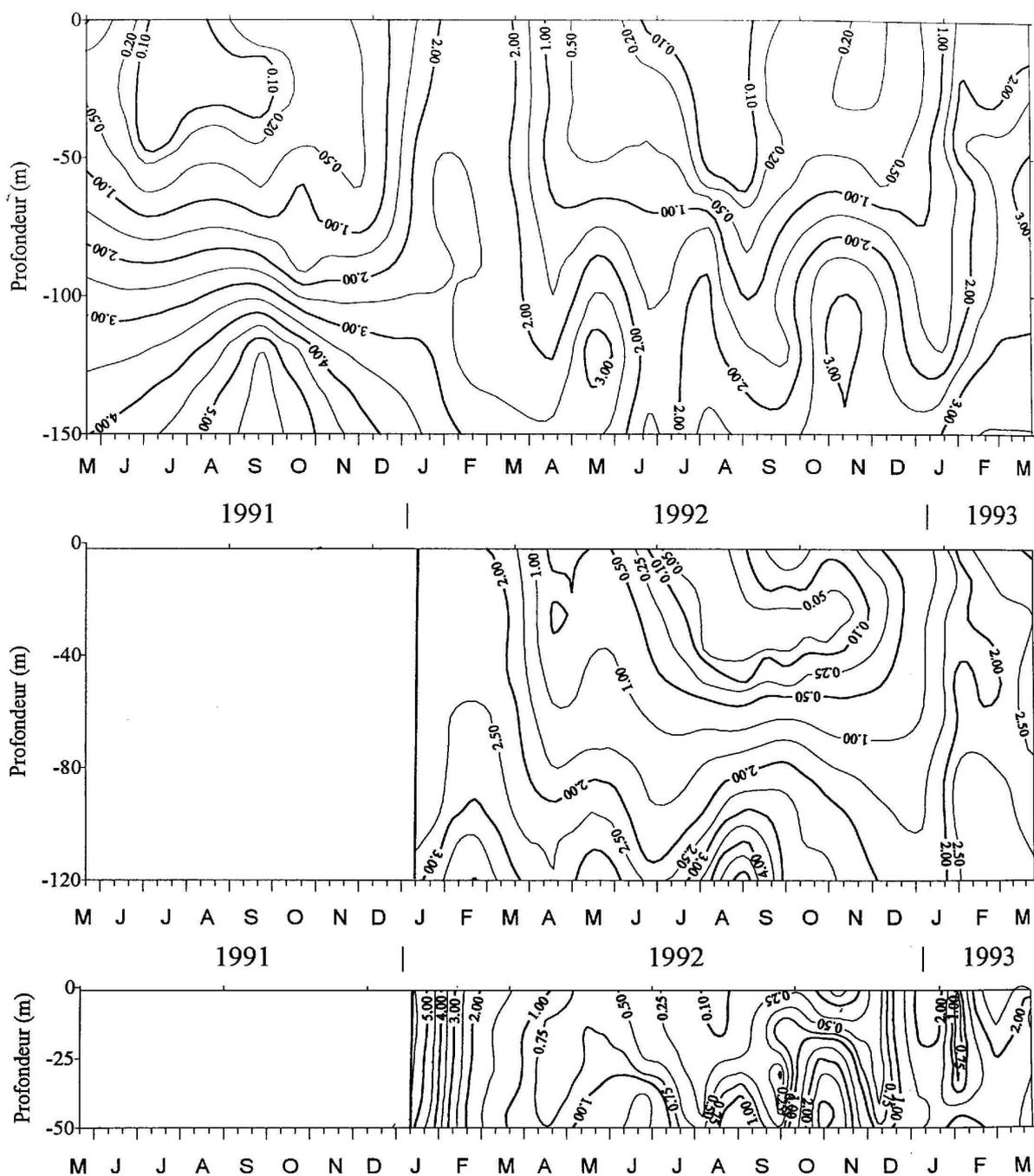
Fig.I.2: Carte générale des sites d'études en Méditerranée nord-occidentale (Golfe du Lion). Programme PHYTOLION (St.1, St.2, St.3) et campagne MEDIMAR (radiale R1 à R5).

Tab.I.1: (a) Position et sonde des stations échantillonnées dans le Golfe du Lion. (b) Dates et navires utilisés au cours des missions GP du suivi PHYTOLION (avril 1991 à mars 1993).

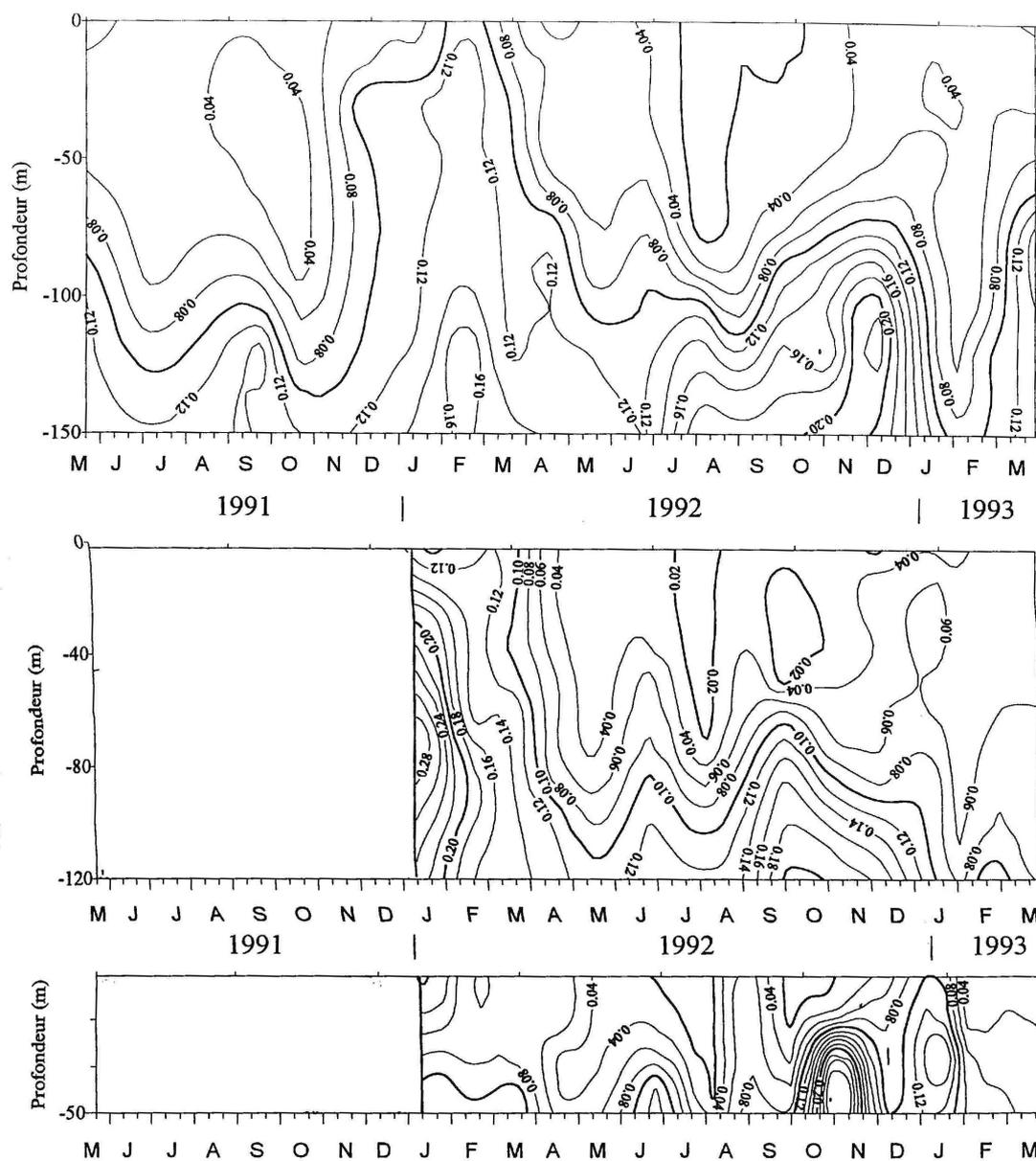
a				b		
Campagne	Station	Position	Fond	Opération	Date	Navire
PHYTOLION	St.3	42°29'N-03°09'E	50 m	GP1	21/05/91	Georges Petit
	St.2	42°27'N-03°25'E	127 m	GP2	12/06/91	Georges Petit
	St.1	42°26'N-03°41'E	770 m	GP3	04/07/91	Georges Petit
MEDIMAR	R1	42°37'N-03°05'E	30 m	GP4	20/09/91	Georges Petit
	R2	42°35'N-03°09'E	58 m	GP5	16/10/91	Georges Petit
	R3	42°28'N-03°35'E	500 m	GP6	04/12/91	Georges Petit
	R4	42°26'N-03°41'E	779 m	GP7	15/01/92	Néreis
	R5	42°21'N-03°55'E	1500 m	GP8	11/02/92	Néreis
				GP9	12/03/92	Georges Petit
				GP10	14/04/92	Néreis
				GP11	14/05/92	Georges Petit
				GP12	21/06/92	Georges Petit
				GP13	27/07/92	Néreis
				GP14	21/08/92	Georges Petit
				GP15	24/09/92	Néreis
				GP16	25/10/92	Georges Petit
				GP17	25/11/92	Néreis
				GP19	06/01/93	Néreis
				GP20	24/01/93	Georges Petit
				GP21	10/02/93	Georges Petit
				GP22	18/03/93	Georges Petit



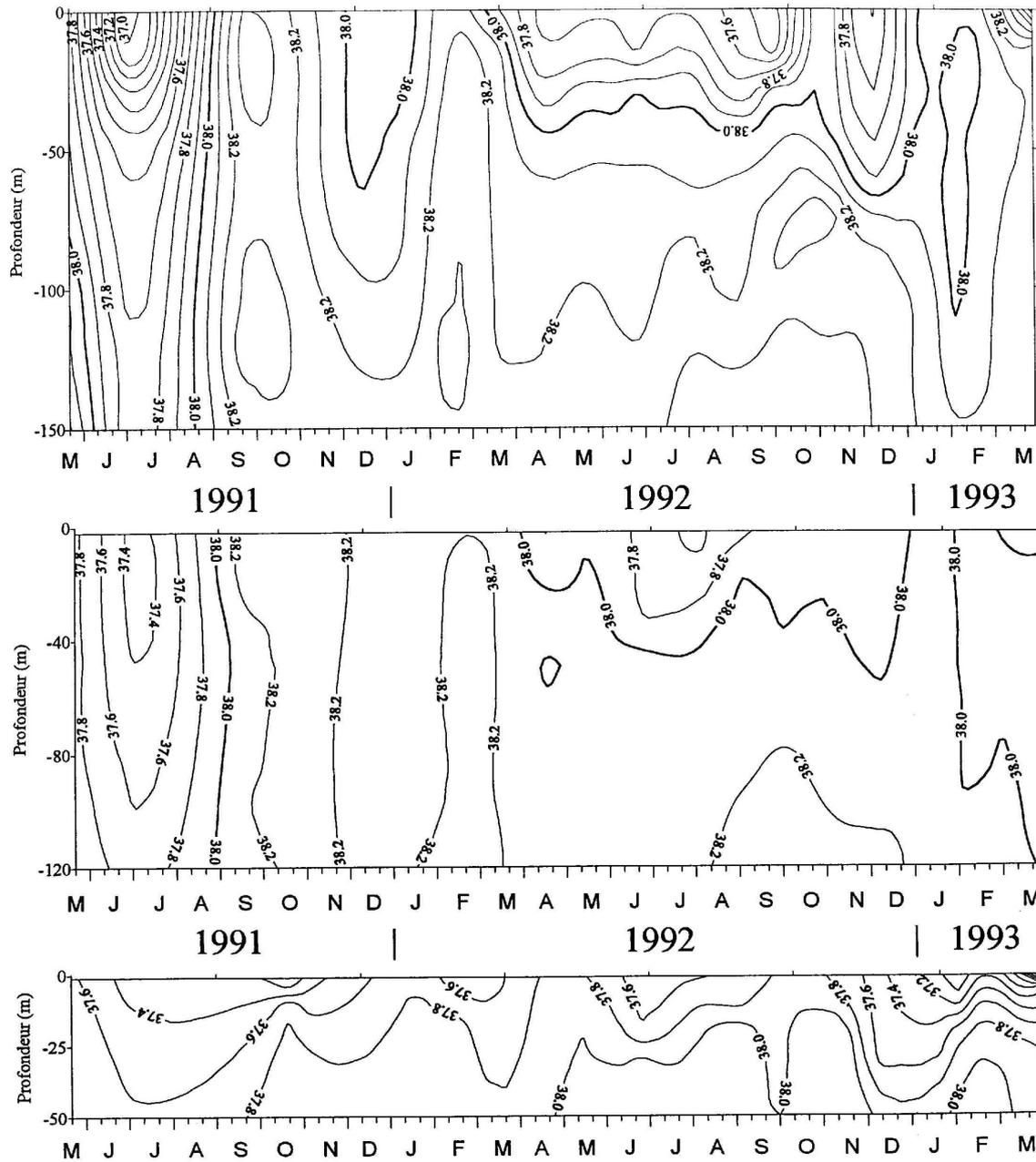
Dosages de Chlorophylle en fonction du temps et de la profondeur dans les trois stations de PHYTOLION (données de F.Lantoine). (Dosages effectués par F.Lantoine). En haut, mesures à la station du large (station 1 de la campagne PHYTOLION), au milieu, mesures à la station intermédiaire, en bas, mesures à la station littorale (station 3 de la campagne PHYTOLION).



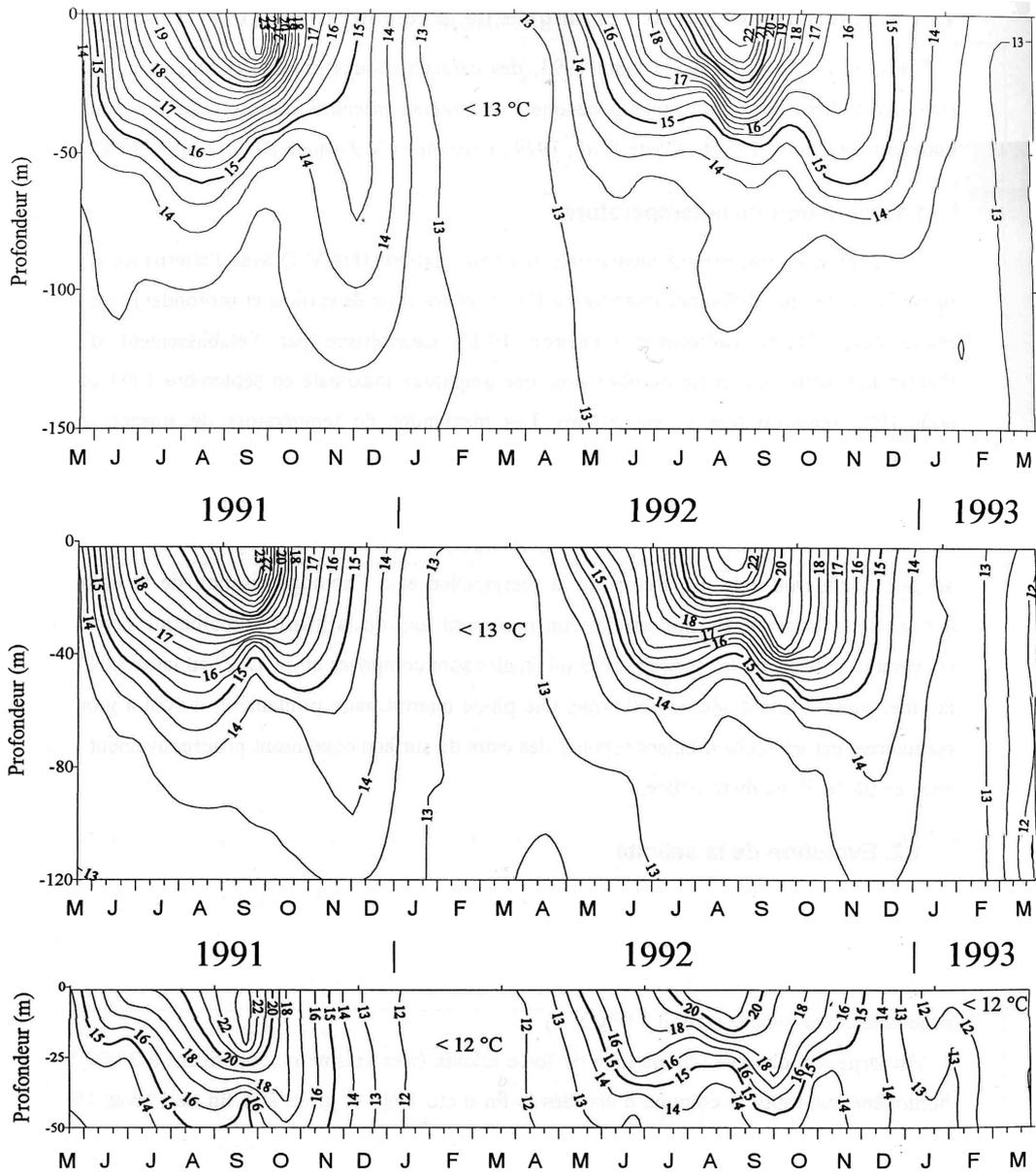
Dosages de nitrates dans les trois stations de PHYTOLION (Dosages effectués par F.Lantoine). En haut, mesures à la station du large (station 1 de la campagne PHYTOLION), au milieu, mesures à la station intermédiaire, en bas, mesures à la station littorale (station 3 de la campagne PHYTOLION).



Dosages de phosphate (Dosages effectués par F.Lantoine). En haut, mesures à la station du large (station 1 de la campagne PHYTOLION), au milieu, mesures à la station intermédiaire, en bas, mesures à la station littorale (station 3 de la campagne PHYTOLION).



Mesure de salinité dans les trois stations de PHYTOLION (Mesures effectuées par F.Lantoine). En haut, mesures à la station du large (station 1 de la campagne PHYTOLION), au milieu, mesures à la station intermédiaire, en bas, mesures à la station littorale (station 3 de la campagne PHYTOLION).



Mesure de température (Mesures de la campagne PHYTOLION). En haut, mesures à la station du large (station 1 de la campagne PHYTOLION), au milieu, mesures à la station intermédiaire, en bas, mesures à la station littorale (station 3 de la campagne PHYTOLION).

## **Annexe 4 : Maturation d'un système « r » vers un système « K »**

Principaux traits de l'évolution d'un écosystème lors de la succession « typique » ou « progressive » (Frontier, 2004)

Écosystème juvénile	Écosystème mature
Sélection d'espèces « r » d'où: reproduction et croissance rapides, espérance de vie faible; souvent une seule reproduction dans la vie, précoce et abondante.	Sélection d'espèces « K » d'où: reproduction et croissance lentes ou modérées, espérance de vie élevée en raison de mécanismes de survie; plusieurs reproductions dans la vie, modérées, la première tardive.
Peu d'espèces: indices de diversité et de régularité faibles; diagrammes rangs- fréquences verticaux, sigmoïdes.	Nombreuses espèces: diversité et régularité élevées; diagrammes rangs fréquences partiellement rectilignes ou à concavité vers le bas.
Productivité ( <i>P/S</i> ) élevée: renouvellement rapide de la biomasse; flux d'énergie et de matière rapides; taux de recyclage de la matière faible ; « gaspillage» de matière et d'énergie	Productivité faible: renouvellement lent de la biomasse; flux d'énergie plus faible à biomasse égale ; recyclage important des éléments biogènes ; « économie» de matière et d'énergie.
Rapport (énergie consacrée à la croissance et à la Multiplication/énergie consacrée aux mécanismes de survie) et rapport (production nouvelle /production de régénération) élevés	Ces rapports faibles.
Peu d'interactions entre espèces, hormis une compétition directe pour l'espace et/ou la ressource trophique.	Réseau complexe d'interactions trophiques et non trophiques (antagonismes, facilitations) d'où partage du biotope et de la ressource, plutôt que compétition.
Espèces peu spécialisées à l'intérieur du biotope colonisé; peu de niches écologiques.	Espèces très spécialisées au sein de l'écosystème; grande diversité des niches écologiques; nombreux cas de symbiose, de parasitisme etc. ; nombreuses espèces auxiliaires à rôles précis.
Simplicité et uniformité du biotope.	Forte hétérogénéité du biotope, accentuée par les transformations suscitées par les nombreuses espèces; mosaïque spatiale.
Réseaux trophiques simples et linéaires.	Réseaux trophiques complexes, ramifiés, à haut degré de spécificité.
Pyramides trophiques larges à la base et peu élevées (peu de niveaux trophiques) ; rendements trophiques faibles.	Pyramides trophiques étroites et élevées (niveaux trophiques plus nombreux, surtout dans les milieux aquatiques) ; rendements trophiques élevés.
Robustesse des individus, des populations et des peuplements vis-à-vis des fluctuations de l'environnement.	Vulnérabilité des espèces et des réseaux d'interactions.
La reconstitution après perturbation redonne l'écosystème pionnier de départ.	La reconstitution ne restitue pas forcément l'écosystème de départ en raison de bifurcations possibles.
Populations se reconstituant vite après un effondrement (élasticité).	Populations lentes à se reconstituer après une catastrophe (se reconstituent le plus souvent par l'intermédiaire d'un nouveau stade juvénile et d'une nouvelle succession).
Biomasses et flux essentiellement « contrôlés de l'extérieur », c'est-à-dire dépendant des fluctuations de la ressource extérieure; grande instabilité quantitative.	Biomasses et flux largement « contrôlés de l'intérieur» grâce à des homéostasies croisées au niveau des populations; stabilité quantitative, résilience, et cependant fluctuations adaptatives; biomasse rendue indépendante des fluctuations de la ressource minérale grâce à la production de régénération
Flux ouvert de tous les éléments nutritifs (le recyclage se fait à échelle planétaire).	Taux élevé de recyclage à court terme des éléments nutritifs peu abondants dans le milieu.

## V.6. Annexe 5 : Equations du modèle neutre

Hubbell a avancé une hypothèse qui prend en contre-pied la vision classique dans son livre « *The Unified Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography* » (Hubbell, 2001). Cette hypothèse considère que les organismes d'un même niveau trophique sont équivalents et que leur évolution est aléatoire. Il est possible de simuler cette évolution aléatoire à chaque temps élémentaire en suivant les pas suivants (Volkov et al., 2003):

- Avec une probabilité  $1-m$ , prélève deux individus de la communauté locale. S'ils sont identiques, aucun changement n'est apporté. S'ils sont différents, l'un des deux est retiré et l'autre est dédoublé. Cela correspond à la perte d'un individu (pour une population abondante, la probabilité de cette perte sera importante) et au remplacement de celui-ci par une naissance (pour une population abondante, forte probabilité de se reproduire).
- Avec une probabilité  $m$ , un individu de la communauté locale est prélevé et remplacé par un individu de la métacommunauté (lui aussi prélevé avec d'autant plus de probabilité qu'il est abondant). Cette situation correspond à l'incorporation d'un individu immigrant à partir de l'environnement extérieur (i.e. métacommunauté).

L'évolution d'une communauté par les règles évoquées ci-dessus peut être décrite par des équations de probabilité. Chaque population a une chance de diminuer d'un individu qui peut être remplacé par un individu immigrant ou par une naissance. Pour qu'une population  $k$  comporte  $N$  individus, il faut donc que précédemment, il y en ait eu  $N-1$  et qu'un événement de naissance se produise, ou qu'il y en ait eu  $N+1$  et qu'un événement de mort survienne. De plus, si la population comporte déjà  $N$  individus, il ne faut pas qu'une naissance ou une mort survienne. Toutes ces conditions sont exprimées dans l'équation suivante :

### Équation V.6-1 : Evolution neutre d'une communauté

$$\frac{dp_{n,k}}{dt} = p_{n-1,k} b_{n-1,k} + p_{n+1,k} d_{n+1,k} - p_{n,k} b_{n,k} - p_{n,k} d_{n,k} \quad (1)$$

avec

$$b_{n,k} = m \frac{\mu_K}{J_M} \left(1 - \frac{n}{J}\right) + (1-m) \frac{n}{J} \frac{J-n}{J-1} \quad (2)$$

$$d_{n,k} = m \left(1 - \frac{\mu_K}{J_M}\right) \frac{n}{J} + (1-m) \frac{n}{J} \frac{J-n}{J-1} \quad (3)$$

Où les notations sont les suivantes

$n,k$  –  $n$  individus dans la population  $k$

$b_{n,k}$  – probabilité que la population  $k$  (comportant  $n$  individus) augmente d'un individu

$d_{n,k}$  – probabilité que la population  $k$  diminue d'un individu

$J$  – nombre d'individu dans la communauté locale

$m$  – probabilité d'immigration

$\mu_K$  – nombre d'individus dans la métacommunauté

$J_M$  – Nombre d'individus dans la métacommunauté

Ainsi,

$$b_{n,k} = \underbrace{(1 - m)}_{\text{Probabilité qu'il n'y ait pas immigration}} \underbrace{\frac{n}{J}}_{\text{Probabilité que la reproduction concerne un individu d'une population K de n individus parmi les J individus de la communauté}} \underbrace{\frac{J - n}{J - 1}}_{\text{Probabilité qu'un individu n'appartenant pas à l'espèce K meurt}} + m \underbrace{\frac{\mu_k}{J_M}}_{\text{Probabilité d'immigration}} \underbrace{\left(1 - \frac{n}{J}\right)}_{\text{Probabilité qu'un individu de l'espèce K immigre}} \underbrace{\left(1 - \frac{n}{J}\right)}_{\text{Probabilité qu'un individu n'appartenant pas à l'espèce K meurt}}$$

Ces équations sont représentées dans le schéma de la page 224.

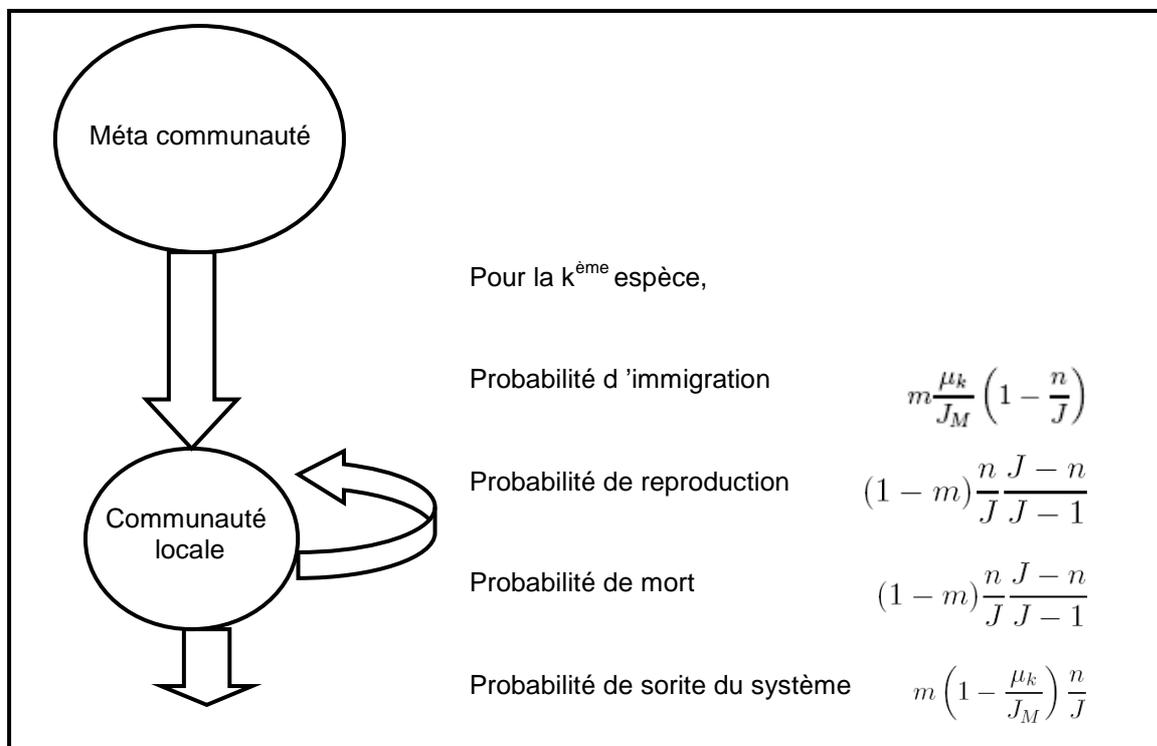


Figure V.6-1 : Modèle neutre de Hubbell, notations de Volkov (Volkov et al., 2003)

## **V.7. Annexe 6 : Publication correspondant aux simulations présentées au chapitre II**

Environmental Microbiology (2006) 8(4), 720–731

doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00950.x

# **Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity**

Patrice Loisel,<sup>1</sup> Jérôme Harmand,<sup>1,2</sup> Olivier Zemb,<sup>2,3</sup> Eric Latrille,<sup>2</sup> Claude Lobry,<sup>1</sup> Jean-Philippe Delgenès<sup>2</sup> and Jean-Jacques Godon<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>INRA-INRIA MERE Research Team, UMR Analyse des Systèmes et Biométrie, ENSAM Institut National de la Recherche Agronomique, Montpellier, France.

<sup>2</sup>Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Institut National de la Recherche Agronomique, Avenue des Etangs, 11100 Narbonne, France.

<sup>3</sup>Laboratoire Arago, Observatoire Océanologique, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National des Sciences de l'University, Université Paris VI, 66651 Banyuls-sur-Mer, France.

### **Summary**

The exact extent of microbial diversity remains unknowable. Nevertheless, fingerprinting patterns [denaturing gradient electrophoresis (DGE), single-strand conformation polymorphism (SSCP)] provide an image of a microbial ecosystem and contain diversity data. We generated numerical simulation fingerprinting patterns based on three types of distribution (uniform, geometric and lognormal) with a range of units from 10 to 500 000. First, simulated patterns containing a diversity of around 1000 units or more gave patterns similar to those obtained in experiments. Second, the number of bands or peaks saturated quickly to about 35 and were unrelated to the degree of diversity. Finally, assuming lognormal distribution, we used an estimator of diversity on *in silico* and experimental fingerprinting patterns. Results on *in silico* patterns corresponded to the simulation inputs. Diversity results in experimental patterns were in the same range as those obtained from the same DNA sample in molecular inventories. Thus, fingerprinting patterns contain extractable data about diversity although not on the basis of a number of

bands or peaks, as is generally assumed to be the case.

### **Introduction**

The estimation of microbial diversity, used here in the sense of species richness, remains a challenge for microbiologists (Hughes *et al.*, 2001; Cases and de Lorenzo, 2002; Curtis and Sloan, 2004). New genetic techniques have revealed extensive microbial diversity that has previously gone undetected with culture-dependent methods (Pace, 1997). Inventories and fingerprinting pattern analysis [denaturing gradient electrophoresis (DGE), single-strand conformation polymorphism (SSCP)] based on 16S rDNA sequences are widely used in microbial ecology studies. Unfortunately, exhaustive inventories still remain impractical as only a tiny fraction can be analysed (Dunbar *et al.*, 2002). Consequently, the exact extent of diversity remains unknown. Despite this limitation, several mathematical methods have been proposed and compared as a way of estimating diversity based on inventory data (Hughes *et al.*, 2001; Dunbar *et al.*, 2002; Martin, 2002; Kemp and Aller, 2004a,b). In a different way, fingerprinting patterns, due to the size of the analysed fraction, can be considered as an 'image' of the whole microbial ecosystem free of inventory limitation. Such a picture of the bacterial community is given by discrete bands or peaks which emerge from the signal subband or subpeak background. Discrete bands or peaks have been associated to numerically dominant sequences whereas the subband or subpeak background has been considered as coming from a large number of numerically subdominant (rare) sequences, and generally omitted from the analysis (Nakatsu *et al.*, 2000; Fromin *et al.*, 2002). From these images, discrete bands or peaks are applied to estimate dynamics and diversities (Muyzer and Smalla, 1998), assuming that each band or peak refers to a unique sequence called a phylotype, ribotype or operational taxonomic unit (OTU). Co-migrating bands or peaks have been anticipated depending on the breadth of the operational frame and the range of the microbial diversity (Schmalenberger and Tebbe, 2003). Co-migrating events

Received 30 June, 2005; accepted 28 September, 2005. \*For correspondence. E-mail jean-jacques.godon@ensam.inra.fr; Tel. (+33) 4 68 42 51 54; Fax (+33) 4 68 42 51 60.

© 2005 Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd  
No claim to original French government works

have been authoritatively described (Kowalchuk and Stephen, 2001; Schmalenberger and Tebbe, 2003) but are generally considered as 'bad luck'.

Although based on the same upstream molecular techniques [DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR)], generally using 16S rDNA genes, the results of molecular inventories of microbial ecosystems give different estimates of diversity when compared with the results derived from fingerprinting methods (Diez *et al.*, 2001). Based on a small number of clones analysed (Kemp and Aller, 2004b), molecular inventories present a large diversity with a low level of dominance and numerous singletons. In contrast, the images generated from a large number of 16S rDNA molecules in fingerprinting patterns have been analysed as presenting a high level of dominance. Statistical bias has generally been evoked to explain this discrepancy but comparisons have rarely been carried out. The first goal of this study was to simulate fingerprinting patterns reflecting known data in accordance with high diversity as found in molecular inventories. The second objective was to verify whether data on microbial diversity can be extracted from fingerprinting patterns using estimators such as those used for molecular inventories (Curtis *et al.*, 2002).

## Results

### Construction of *in silico* fingerprinting patterns

The general assumption about fingerprinting patterns is that: (i) visible units correspond to dominant units and (ii) without visible units, high diversity generates a strong background. The simulation with 5000 different phylotypes (called units in the simulation) is shown in Fig. 1. Surprisingly, the *in silico* pattern did not only give a strong background but also visible units (band or peak) to the number of about 35 which was notably less than the 5000

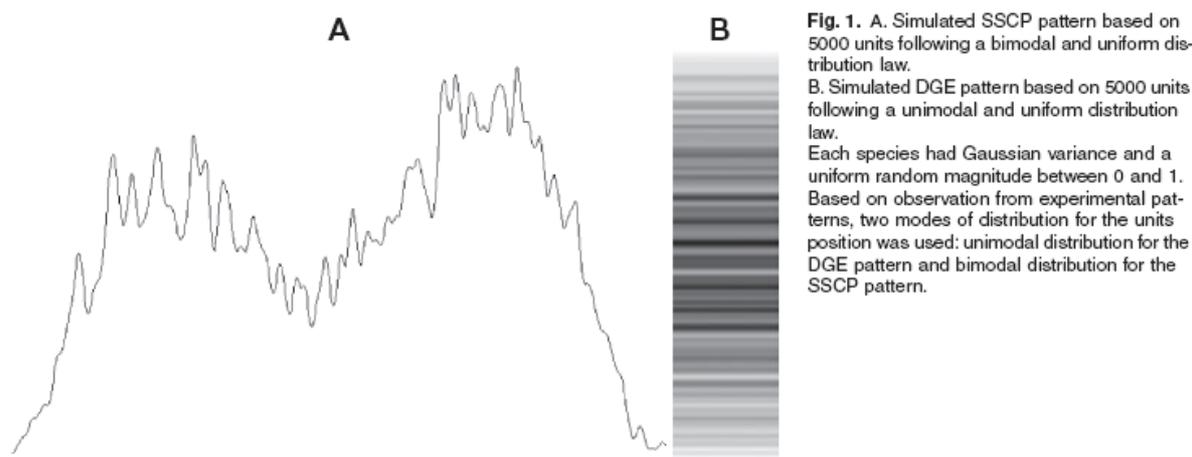
expected. Thus, in this case, all discrete units (peak or band) correspond to the sum of several units. Moreover, fingerprinting patterns containing discrete bands or peaks were compatible with very high diversity in the sample.

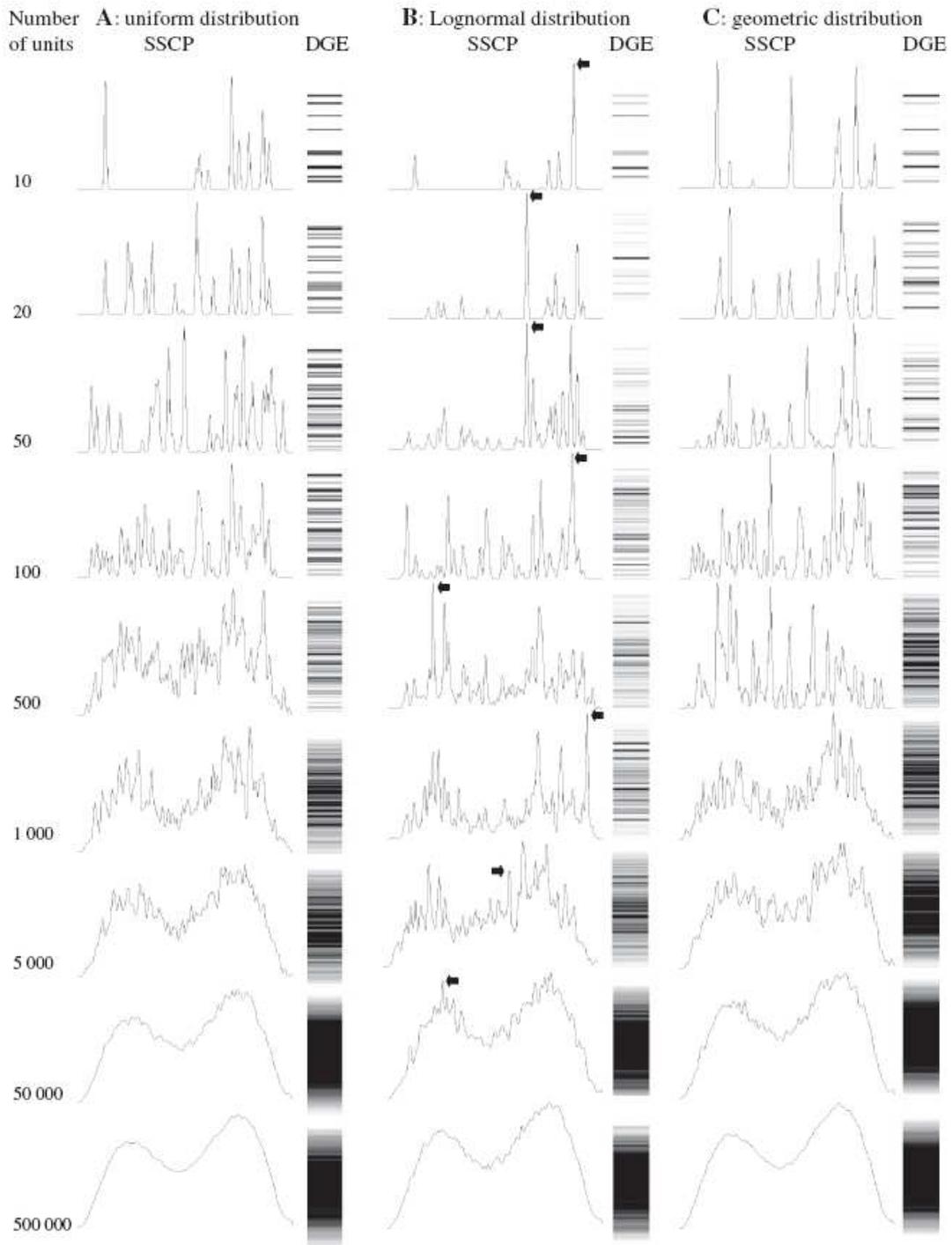
### Patterns generated by the variation of the number of unit based on uniform distribution

The exact extent of the microbial diversity remained unknown. To make up for this missing data, variations in the number of units from 10 to 500 000 were simulated. Figure 2A presents the SSCP and DGE patterns obtained. The simulation confirmed the previous results: the number of bands or peaks stabilized rapidly around 35 when the number of units increased. Figure 3A presents the number of bands or peaks versus the number of units. Very quickly, the number of bands or peaks is less than the real number of units. Thus, the number of bands or peaks is clearly not usually a measure of the diversity. Except in the case of an obvious dominance of a low number of units, the visible diversity rapidly becomes a function of the size of the reading window and the number of units (variance of the Gaussian curve).

### Addition of dominants

Even if in some cases diversity may be composed of only a large number of numerically subdominant species (Zhou *et al.*, 2002), the above simulated results should only be considered as an example. Indeed, it is obvious that the distribution of the diversity in a real microbial ecosystem is not 5000 phylotypes with a uniform random magnitude between 0 and 1. Experimental results obtained by molecular inventory have shown that the number of rare phylotypes represents a large fraction (79%) but not the totality of the phylotypes (Kemp and Aller, 2004b). Moreover, 1%





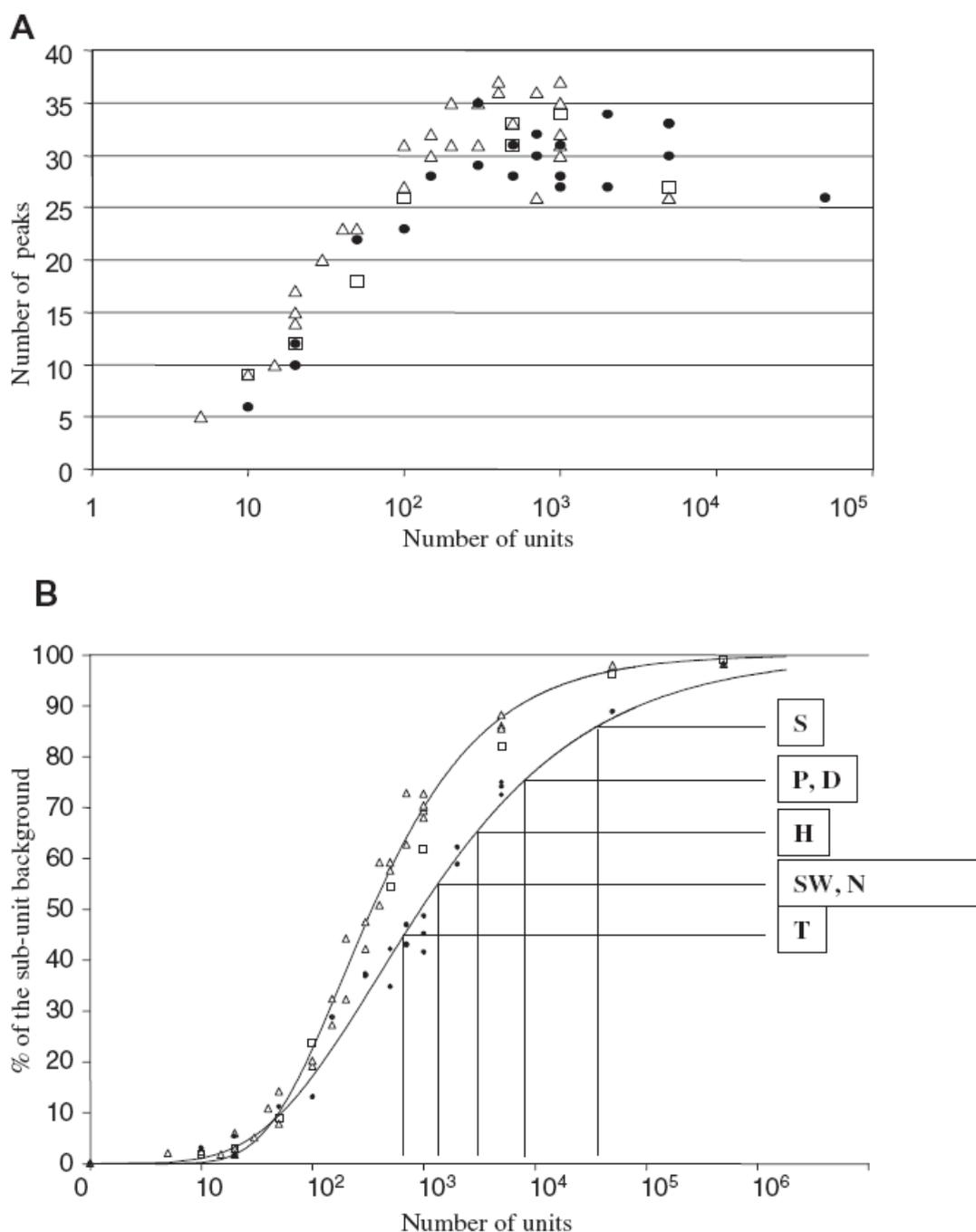
**Fig. 2.** Simulated SSCP and DGE patterns.

A. Uniform distribution.

B. Lognormal distribution.

C. Geometric distribution.

For lognormal distribution the position of the most abundant unit is indicated by an arrow.

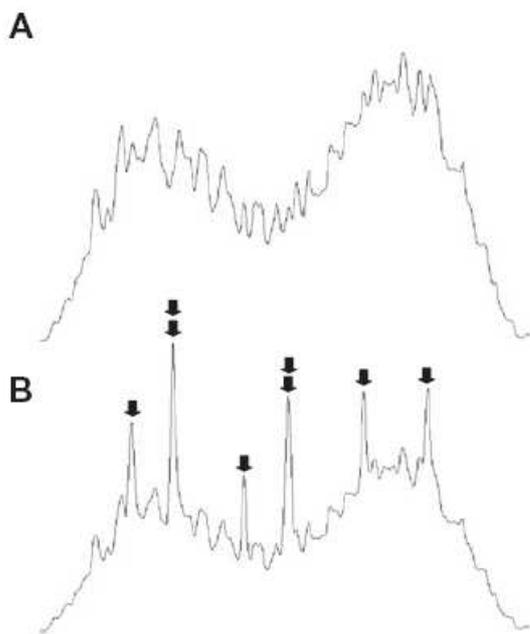


**Fig. 3.** A. Number of peaks on simulated SSCP patterns versus the number of units. Uniform distribution is indicated by white triangles; lognormal distribution is indicated by black dots; geometric distribution is indicated by white squares.

B. Percentage of the subunit background (area under the peaks) on simulated SSCP patterns versus the number of units.

Simulation values obtained from uniform distribution are indicated by white triangles; simulation values obtained from lognormal distribution are indicated by black dots; simulation values obtained from geometric distribution are indicated by white squares. A Gompertz curve joins the uniform and lognormal simulation value. Dotted lines indicate the percentage of the subunit background measured from experimental samples (Fig. 5 and Table 2). S, P, D, H, SW, N, T correspond, respectively, to soil, pig slurry, anaerobic digester, human faeces, sea water, lab-scale nitrification reactor, tick.

724 P. Loisel et al.



**Fig. 4.** A. Simulated SSCP pattern; 100% is from 4600 units following a bimodal and uniform distribution law. B. Simulated SSCP pattern; 92% of the pattern is constituted by 4600 units following a bimodal and uniform distribution law and 8% of the pattern is constituted by eight units following a bimodal and uniform distribution law. The position of these eight units is indicated by arrows.

was previously considered as the abundance limit for denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) detection (Fromin *et al.*, 2002). As an example, Fig. 4 shows two patterns with 4600 and 4608 units. On the 4608 unit pattern, eight dominant units representing 8% of the signal were added to a pattern with 4600 subdominant units. These units had an amplitude of: 40, 40, 50, 50, 50, 50, 60 and 60 and random abscises of: 314, 379, 141, 594, 205, 498, 382 and 205. The remaining 4600 subdominant units represent 92% of the signal. Added units corresponded to dominant visible peaks with two co-migrations due to the random abscises (Fig. 4) but some other visible peaks corresponded to the sum of subdominant units.

#### Patterns generated by variation in the number of units with lognormal and geometric distribution

Several different types of distribution have been proposed for describing species abundance in plant, animal and microbial communities (Bell, 2000). Of these, lognormal and geometric distributions have been the most frequently observed in macroecosystems (Narang and Dunbar, 2004). Figure 5 compares uniform, geometric and lognormal abundance distribution of theoretical communities having a similar number of individuals. Abundance of rare,

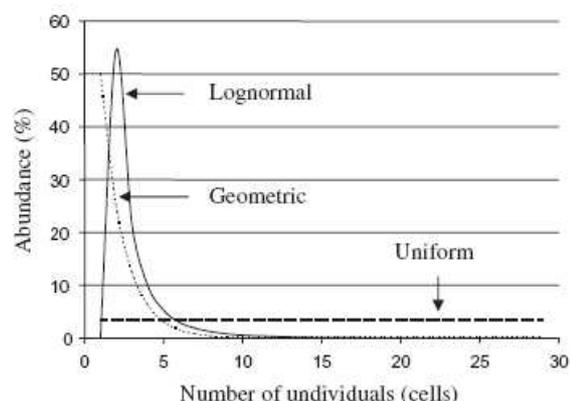
median and dominance units is the most notable difference among the curves. Thus, lognormal and geometric types of species distribution were simulated and compared with the uniform type. The SSCP and DGE patterns, as a function of the number of units from 10 to 500 000, are presented for lognormal (Fig. 2B) and geometric (Fig. 2C) distribution. For lognormal distribution, the curves were defined to respect the hypothesis of  $N_{\min} = 1$  (see *Experimental procedures*). The same modes of fingerprinting distribution were used: unimodal distribution for the DGE pattern and bimodal distribution for the SSCP. Independently of the distribution, the simulations confirmed the previous results: the number of visible units saturated around 35. The number of visible peaks versus the number of units is presented in Fig. 3A.

#### Link between signal background and diversity in simulated patterns

Fingerprinting pattern information can be divided into two parts: peaks or bands and signal subpeak background. Signal subpeak background, defined as the part of the signal without visible bands or peaks, formed an important part of the signal in fingerprinting patterns. Clearly, the part of the total signal corresponding to the subpeak background increases with the diversity (Fig. 3B). Between 50 and 500 units, the signal subpeak background ratio jumped from 10% to 50%. A very high level of diversity, around 50 000, leads to the absence of visible bands or peaks. The signal was constituted only of a subpeak background (Fig. 2).

#### Stability of the fingerprinting pattern

Fingerprinting patterns were formed either totally (uniform distribution) or partially (geometric or lognormal distribu-



**Fig. 5.** Comparison of uniform, geometric or lognormal density law. The three theoretical microbial communities are the same size but display different abundance distribution.

tion) by a large number of subdominant units. The stability of the pattern was tested by withdrawing one-fifth of the subdominant units (1000 units) from a 5000-unit pattern. This large 'extinction' induced only very small changes in fingerprinting patterns, in terms of visible bands or peaks (data not shown). In fact, such 'extinction' had an impact on the pattern only if dominant units were affected in the case of geometric or lognormal distribution. Thus, the stability of fingerprinting patterns needs very careful interpretation: even if the detectable diversity is stable the undetectable diversity might be subject to a great deal of unobservable change.

#### Distinguishing peaks of unique and non-unique origin

Distinguishing between the peak fraction and the subpeak background fraction is not easy. In fact, peak fraction corresponds to peaks formed by one single unit whereas the subpeak background fraction represents the rest of the signal, including peaks formed by more than one unit. Thus, the ability to distinguish between peaks generated by one or more than one unit is crucial. The measurement of the peak variance can provide a clue. In fact, if one peak is generated by several units (from 2 to  $n$ ) with close but different migration parameters, its variance is larger than a peak generated by one or more units with identical migration parameters (*Experimental procedures*).

#### Measurement of diversity

In the case of simulations of fingerprinting patterns, the number of visible bands or peaks cannot be used to estimate diversity and the subpeak background ratio gives only a rough indication of the diversity (Fig. 3B). However, Curtis and colleagues (2002) propose a method for estimating the true diversity of prokaryotic communities ( $S_T$ ) by calculating the ratio of two measurable variables: the number of individuals in the sample ( $N_T$ ) and the abundance of those most abundant in the sample ( $N_{max}$ ). These authors made only two assumptions: a lognormal distri-

bution and the abundance of the unique least-abundant species ( $N_{min}$ ) to be 1 (Curtis *et al.*, 2002).

#### In silico validation of the diversity measurement

The Curtis estimator was first applied to lognormal distribution simulating fingerprinting patterns.  $N_T$  are known as the input of simulation and  $N_{max}$  can either be read from input of simulation or be measured from the simulated pattern. Thus, two values of the number of phylotype  $S_T$  were obtained: the first, only a calculation, was used to verify the Curtis estimator and the second, a measurement, checked the use of fingerprinting patterns (Table 1). In both values, the errors vary between 10% and 75% and this discrepancy seems to have come mainly from the estimator but not from the measurement.

#### Experimental validation of the measurement of diversity

Experimental patterns occurred in a wide variety but the real diversity and distribution remained unknown, in contrast to the *in silico* pattern. Using the same hypothesis (lognormal distribution,  $N_{min} = 1$  and  $N_T$  known, and  $n_{max}/n_T$  measured from the fingerprinting pattern) (see *Experimental procedures*), the bacterial diversity can be estimated. Figure 6 presents seven experimental SSCP patterns representing various microbial ecosystems (tick, nitrification reactor, sea water, human faeces, pig slurry, anaerobic digester, soil). The patterns were classified on the basis of the subpeak background ratio. Table 2 shows diversity results obtained from these seven SSCP patterns based on the Curtis estimator. In five of the seven examples (nitrification reactor, sea water, human faeces, pig slurry and anaerobic digester), the results have been compared with those obtained from molecular inventories as an independent source (Godon *et al.*, 1997; Suau *et al.*, 1999; Snell-Castro *et al.*, 2005; D. Bougard, unpublished; M. Larcher, unpublished) in order to estimate the most abundant members of that community. The definition of a unit in these molecular inventories (OTUs, ribotypes, phylotypes) was slightly different: for nitrification digester, sea

**Table 1.** Validation of the Curtis estimator for fingerprinting simulation patterns with lognormal distribution.

Input data Lognormal parameters		$N_T$	Calculated value		Measured value	
$S_T$	$\mu, \sigma_G$		$N_{max}$	$S_T$	$N_{max}$	$S_T$
10	2.25, 1.5	203	89	14	74	16
100	3.25, 1.5	6 601	486	175	485	175
1 000	4.25, 1.5	226 082	12 549	733	10 170	880
10 000	5.35, 1.5	6 472 186	127 311	5 604	133 000	5 398
100 000	6.85, 1.5	292 790 615	987 613	90 363	740 000	112 689

$S_T$  corresponds to the number of units within an *in silico* pattern;  $N_T$  corresponds to the number of individuals in the simulation sample;  $N_{max}$  corresponds to the number of individuals in the most frequent unit or phylotype.

726 P. Loisel et al.

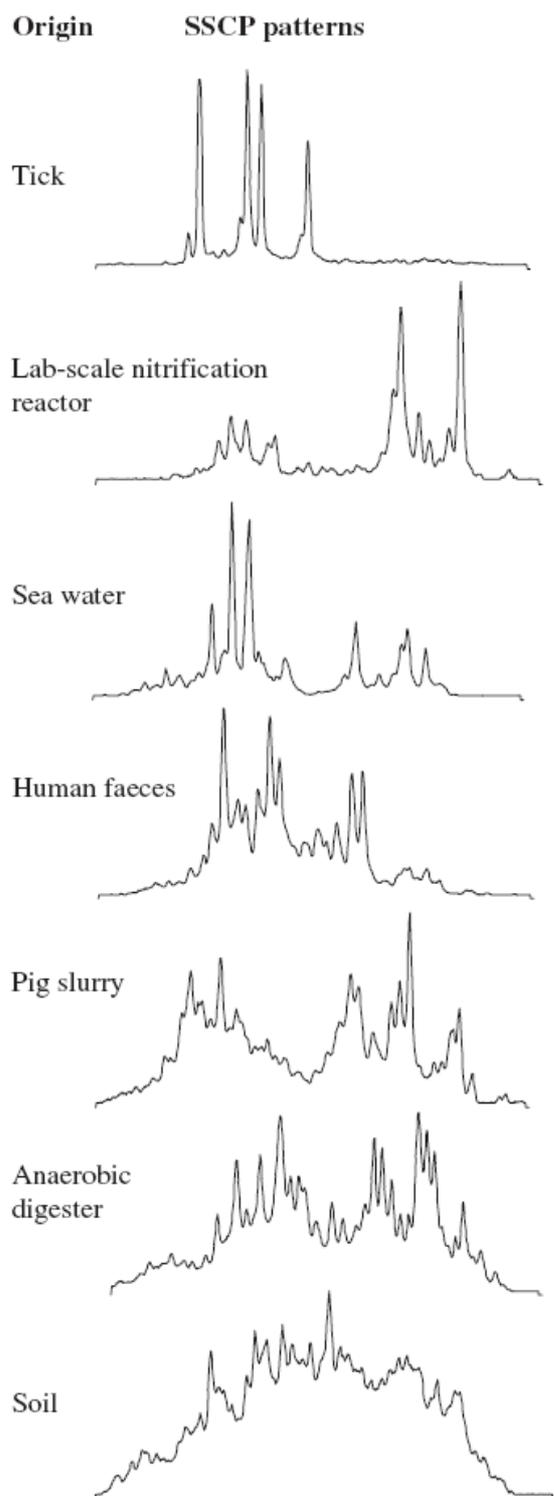


Fig. 6. The SSCP patterns from various experimental samples.

water, human faeces, pig slurry and anaerobic digester, respectively, either identical correspondence of the 16S rDNA V3 region, restriction fragment length polymorphism (RFLP) pattern, 98% of 16S rDNA similarity, 97% of 16S rDNA similarity and 97% of 16S rDNA similarity. Around  $N_{max}$ , the lower and upper limits of the binomial confidence interval are indicated, given at 95% confidence level, as also is its impact on  $S_7$  estimation. The number of visible peaks never goes beyond 35, as shown in the *in silico* patterns. The subpeak background ratio is also indicated in Table 2. These experimental values are compared in Fig. 3B with values obtained with *in silico* patterns. The comparisons show that the subunit background percentage gives an indication of the diversity.

#### Division of total bacterial diversity

To check the robustness of this measurement, three fractions of the same experimental sample were compared with the measurement of total sample (Fig. 7). The three fractions corresponded to three phylogenetic groups of the bacterial kingdom (*Clostridiaceae*, *Lactobacillus-Streptococcus* and *Bacteroides-Prevotella*) (P. Peu, unpublished). The selection was based on specific primer amplification (P. Peu, unpublished). The ratio of each group in the two ecosystems tested, pig slurry and pig faeces, was unknown. Thus, the value of 20% for each, used in  $N_7$  value, was arbitrarily chosen but was compatible with published data on both these microbial ecosystems (Leser *et al.*, 2002; Snell-Castro *et al.*, 2005). The results presented in Table 3 show no major discrepancy between the diversity shown as the sum of the three groups, 6695 and 8940, compared with the measurement of the total diversity, 5543 and 8257 respectively.

#### Discussion

Fingerprinting pattern data (DGE, SSCP) have mainly been exploited as discrete bands or peaks in the study of temporal or spatial stability, for identification and even for estimating diversity. The rest of the signal (called subband or subpeak background) has been considered as meaningless. In the present work, computer-based numerical simulations show that fingerprinting patterns contain data about the overall diversity of microbial ecosystems providing information that can be extractable. Thus, possible measurement of the microbial diversity is proposed here based on the Curtis estimator and associated assumptions (Curtis *et al.*, 2002).

#### Link between visible bands or peaks and diversity

Whatever the distribution (uniform, lognormal and geometric) used in simulation, the number of visible units

Table 2. Measurement of bacterial diversity using the Curtis estimator from molecular inventories and SSCP patterns.

Microbial ecosystem	Number of bacterial genome in a sample: $N_T^a$	Molecular inventories				SSCP profiles				References
		Number of bacterial sequences analysed	Number of phylotypes <sup>b</sup>	Frequency of the most abundant phylotype <sup>c</sup> $n_{max}/n_T$	Diversity estimated by phylotype abundance $S_T$	% of the most abundant peak $n_{max}/n_T$	Diversity estimated by peak abundance $S_T$	Number of peaks	% of the subpeak background	
Tick	$10^5$	nd	nd	nd	nd	13.8%	200	7	46	L. Halos (unpublished)
Lab-scale nitrification reactor	$10^6$	43	21 (V3 region)	$11.8 < 23.3 < 38.6\%$	$109 < 235 < 550$	8.9%	743	17	55	D. Bougard (unpublished)
Sea water	$10^7$	118	15 (RFLP)	$7.3 < 12.7 < 20.1\%$	$512 < 958 < 1840$	9.6%	1347	15	56	M. Larcher (unpublished)
Human faeces	$10^7$	284	82 (98%)	$5.2 < 8.1 < 11.9\%$	$1040 < 1637 < 2628$	5.9%	2003	17	65	Suau <i>et al.</i> (1999)
Pig slurry	$10^7$	202	108 (97%)	$5.4 < 8.9 < 13.7\%$	$868 < 1470 < 2544$	3.3%	4128	29	75	Snell-Castro <i>et al.</i> (2005)
Anaerobic digester	$10^7$	460	133 (97%)	$3.0 < 4.8 < 7.2\%$	$1874 < 2855 < 4430$	2.5%	5199	29	74	Godon <i>et al.</i> (1997)
Soil	$10^{9a}$	nd	nd	nd	$7188 < 11755 < 19671$	1.2%	20456	31	87	P. Peu (unpublished)

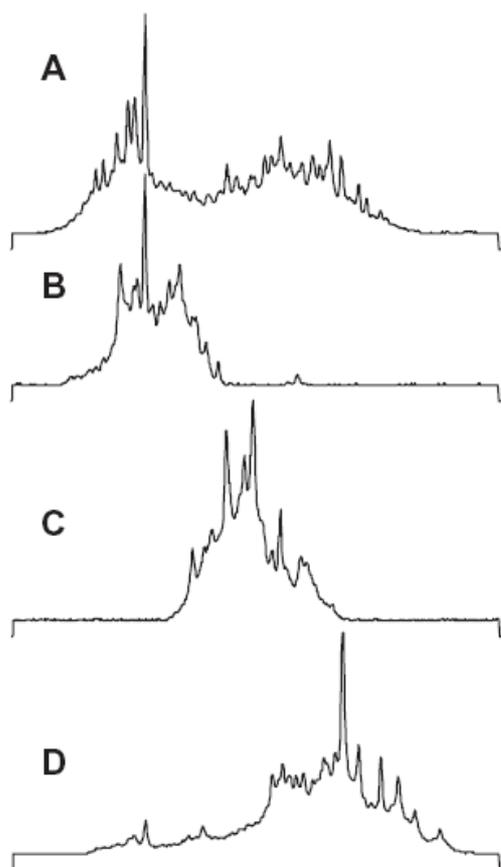
a. Number of bacterial genomes in the sample before PCR amplification.

b. Definition of phylotype in published work indicated in brackets.

c. Measured value is indicated in bold; lower and upper limits of the binomial confidence interval were calculated based on 95% confidence level.

d. Number of bacterial cells in a sample used in the Curtis publication (Curtis *et al.*, 2002).

nd, not determined.  $S_T$  corresponds to the number of phylotypes within the experimental pattern;  $N_T$  corresponds to the number of individuals in the experimental sample;  $N_{max}$  corresponds to the number of individuals in the most frequent phylotype;  $n_{max}/n_T$  corresponds to the frequency of the most frequent sequence in molecular inventories or the frequency of the most frequent peak within the SSCP pattern.



**Fig. 7.** The SSCP patterns from pig faeces sample.  
 A. Corresponds to the total bacterial pattern.  
 B. Corresponds to the *Clostridiaceae* group pattern.  
 C. Corresponds to the *Bacteroides-Prevotella* group pattern.  
 D. Corresponds to the *Lactobacillus-Streptococcus* group pattern.

rapidly reached a maximum. This maximum was around 35 in the conditions of simulation used, which is close to experimental data (Figs 2 and 3A). This maximum depends on the reading frame as well as on the resolution, which is conditioned by the technical parameters of the method used: here the SSCP method, but easily trans-

posable to the DGE method. Some other fingerprinting techniques such as automated ribosomal intergenic sequence analysis (A-RISA) (Ranjard *et al.*, 2001) may enable more units to be seen and can be considered even though the definition of the units (ribosomal intergenic region) differs. In all cases, this asymptotic number is rapidly reached (Fig. 3A). Thus, excepting ecosystems presenting a low number of bands or peaks (below 10), it is clear that in a large majority of cases discrete bands or peaks of fingerprinting patterns cannot be used directly as an estimator of the diversity. This is the first lesson of numerical simulation. The fact that one peak or band may hide more than one rDNA sequence has already been described (Dabert *et al.*, 2005) and sometimes a large number – up to 60 – may be hidden (Schmalenberger and Tebbe, 2003) and, thus, never assessed. The second more unexpected lesson of numerical simulation is that high diversity (up to 1000 units) generates patterns which are indeed readable. A very large number of units (more than 50 000) can occur before a pattern appears smeared. For example, very high diversity estimated for two soil samples has been published: about 3000–8000 species from Arizona soil (Dunbar *et al.*, 2002) and at least 8800 species from Norwegian soil (Ovreas and Torsvik, 1998). Both have proved compatible with a readable pattern. Moreover, a band or peak measurement of variance and standard deviation from the Gaussian curve make it possible to discriminate between bands or peaks coming from a single phylotype and those from multiple phylotypes (two or more). Another positive point is that the fingerprinting pattern was different according to the distribution (Fig. 2) and contains information about these data that may be exploitable.

#### Type of microbial distribution

Simulation with uniform distribution gave patterns with visible bands or peaks which do not correspond to real units. This observation does not fit in with the majority of the experimental cases where visible bands or peaks are identified within a complex pattern. The addition of dominant units (around 1%) in a uniform distribution pattern

**Table 3.** Diversity of subgroups of the bacterial diversity.

Phylogenetic group	$N_r^a$	Pig slurry sample		Pig faeces sample	
		$n_{max}/n_T$	$S_T$	$n_{max}/n_T$	$S_T$
<i>Clostridiaceae</i>	$2 \times 10^6$	4.8%	1705	1.7%	4127
<i>Lactobacillus-Streptococcus</i>	$2 \times 10^6$	3.5%	2290	6.5%	1274
<i>Bacteroides-Prevotella</i>	$2 \times 10^6$	2.9%	2700	2.1%	3539
Total of group diversity			6695		8940
Bacteria total	$10^7$	2.4%	5543	1.5%	8257

a. The ratio of each phylogenetic group is arbitrarily defined as 20% of the total bacterial community.  $n_{max}/n_T$  corresponds to the frequency of the most frequent peak within the SSCP pattern.

shows clearly the emergence of these units even if they represent only a small fraction of the total (Fig. 4). In contrast to uniform distribution, lognormal and geometric distributions present dominant units (Fig. 5) and simulation gave patterns closer to reality. This convergence should enrich the debate about the distribution of species abundance in microbial ecosystems (Curtis *et al.*, 2002; Narang and Dunbar, 2004) and supports the tentative use of lognormal distribution by the Curtis estimator. Moreover, this low level of dominance fits in with evidence from the data of molecular inventories (Kemp and Aller, 2004b).

#### Measurement of diversity from simulated and experimental patterns

However, simulations of lognormal and geometric distribution patterns are closer to real patterns than are uniform distribution patterns. Within lognormal and geometric distribution patterns most of the dominant peaks or bands correspond to real dominant units, even if 1% is sufficient to be dominant (Fig. 4). Two measurements can be extracted from fingerprinting patterns to estimate microbial diversity. The first is the measurement of the subpeak area (Fig. 3B). This is only a rough estimate because as the peak number increases, the value rapidly reaches a plateau. The second measurement is based on the Curtis estimator (ratio between the total number of individuals in the community and the abundance of the most abundant members of that community) (Curtis *et al.*, 2002). This estimator, proposed for molecular inventories, requires an assumption of lognormal distribution. This estimator, tested on numerical simulation patterns, refined the simulated diversity (Table 1). From experimental data, the degree of diversity obtained by the Curtis estimator is roughly double that of the SSCP pattern when compared with inventory results (Table 2). This overestimate could be explained in at least two ways. First, by the cut-off used (Acinas *et al.*, 2004): in molecular inventories, OTUs, ribotypes or phylotypes have generally been clustered on the basis of 97% similarity whereas the cut-off in fingerprinting is an identical sequence in a short variable region (around 180 bp). For example, in a phosphate-accumulating microbial ecosystem, the number of phylotypes based on the 16S rDNA V3 region is double that based on a 97% similarity (Dabert *et al.*, 2001). Second, by the imprecision of the  $n_{\max}$  measurement in molecular inventories as shown by the binomial confidence interval (Table 2): fingerprinting pattern measurement of diversity gives results similar to those of a molecular inventory but the actual process is much cheaper and faster. Thus, such pattern measurement could facilitate the rapid comparison of a large set of data. This measurement of diversity should be applicable using all fingerprint methods with continuous (SSCP, DGE) or discrete (A-RISA, terminal RFLP; Liu *et al.*, 1997) unit sep-

aration. Although applicable the measurement should not strictly be comparable due to method-specific definition of the diversity unit [V3 region, internally transcribed spacer (ITS), restriction sites]. Moreover, the accuracy of the ratio  $n_{\max}/n_T$  is assessed taking into account the totality of PCR products and not merely a subsample, as in a cloning procedure. As a result, this method is more precise due to the large number of molecules analysed and this precision is proved by the reproducibility of the patterns. The remaining difficulty is the measurement of  $N_T$ , the number of individuals in the sample. Curtis used the estimated number of bacteria in the sample (Curtis *et al.*, 2002), whereas here we have used the estimated number of bacterial genomes before PCR amplification (see *Experimental procedures*). The number of bacterial genomes in PCR DNA matrices is considered as a final subsample of the microbial community. This measurement is 100 times lower than the Curtis value. This discrepancy changed the estimate and the result corresponds roughly to a fourfold division. The variable number and the sequence variation of the 16S rDNA also impaired the results, so suggesting investigation of other DNA sequences (Dahlhoff *et al.*, 2000). Thus, these approximations, along with the classic PCR bias (Suzuki and Giovannoni, 1996), remain a source of error in estimating  $S_T$ . The other validations, based on measurements from simulated patterns and totalized subgroup diversities, have shown the robustness of the approaches but, also, the relative imprecision of the measurement (Tables 1 and 3).

In conclusion, and contrary to molecular inventories, fingerprinting patterns do not reflect only a tiny fraction of reality but correspond to a representation of the whole microbial consortium. Numerical simulation of fingerprinting patterns shows that this picture can be used to estimate microbial diversity but not by reference to the number of visible bands or peaks. Using the Curtis estimator is one possibility for extracting diversity data from fingerprinting patterns. Despite approximations, such estimates are robust, rapid, inexpensive and provide a way of comparing microbial diversity. Moreover, the fact that diversity data are accessible in fingerprinting patterns may enhance methods of estimation. Thus, paradoxically, it may turn out that diversity will be easier to measure in microbial communities than in communities of macroorganisms.

## Experimental procedures

### Definition of terms used

DGE: includes fingerprinting methods based on denaturing gradient electrophoresis, such as DGGE, temperature gradient gel electrophoresis (TGGE), temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE).

Band, peak: correspond, respectively, to visible elements within experimental or simulated DGE and SSCP patterns.

730 P. Loisel et al.

Unit: *in silico* pattern counterpart of a phylotype from an experimental pattern.

$S_T$ : number of units or phylotype within *in silico* and experimental patterns respectively.

$N_T$ : number of individuals in the experimental or simulation sample.

$n_T$ : number of individuals in the cloning sample or SSCP pattern.

$N_{\max}$ : number of individuals in the most frequent unit and phylotype in the simulation or experimental sample.

$n_{\max}$ : number of individuals in the most frequent phylotype in the cloning sample or SSCP pattern.

$N_{\min}$ : number of individuals in the least abundant unit or phylotype in the simulation or experimental sample.

### Generation of fingerprinting patterns

Simulated fingerprinting patterns were generated following four parameters: (i) the number of units (corresponding to bacterial phylotype), (ii) the shape of the units (corresponding to gel resolution), (iii) the position of the unit in the pattern (corresponding to condition of migration) and (iv) the intensity the units (corresponding to the number of individuals in each phylotype).

The number of units  $S_T$  was carried out in simulation for various values from 10 to 500 000.

As for experimental patterns the shape of each single unit being represented in the pattern by a Gaussian curve function. All units had a constant variance, ( $\sigma_0^2$ ) which corresponds to the experimental measurement of a single SSCP peak. The position of the unit in the pattern was randomly determined according to experimental observations of the size of the window (750 scans) and distribution curve (bimodal for SSCP pattern and unimodal for DGE pattern). The intensity the units within the simulated pattern follow distribution laws (uniform, lognormal and geometric).

Simulated patterns were generated according to the following equation:

$$y = \sum_{i=1}^{S_T} \frac{a_i}{\sigma_0} \Phi\left(\frac{x-b_i}{\sigma_0}\right) \text{ for } x = 1 \text{ to } 750$$

where,  $S_T$  is the number of species,  $\Phi$  is a Gaussian-centred unit variance density,  $\sigma_0$  is the standard deviation,  $x$  is the position of the scan,  $i$  is the number of individuals in phylotype and  $a_i$  was derived from a probability density law  $g$ .

For uniform density,  $g$  depends on  $U[0, 2N_G]$ ,  $g(a) = \frac{1}{2N_G}$ .

For lognormal density,  $g$  depends on parameters  $\mu$  (mean) and  $\sigma_G^2$  (variance):

$$\log(a_i) \sim N(\mu, \sigma_G^2), g(a) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_G} \exp\left(-\frac{1}{2\sigma_G^2}(\log a_i - \mu)^2\right)$$

the  $\sigma_G$  value is 1.5 and the  $\mu$  values are, respectively, 2.25, 2.80, 2.80, 3.25, 4.20, 4.75, 5.35, 6.60 and 7.00 for 10, 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 50 000 and 500 000 units.

For geometric density,  $g$  depends on parameter  $p$ ,  $g(a) = Cp^a$ .

The position of each peak  $b_i$  was derived from a bimodal probability density law  $f$ :

$$f(x) = C \left[ \frac{x}{750} \left( 1 - \frac{x}{750} \right) \right]^2 \left[ 0.03 + \left( \frac{x}{750} - 0.475 \right)^2 \right]$$

for SSCP patterns. The position of each band  $\mu_i$  was derived from a unimodal probability density law  $f$ :

$$f(x) = C' \frac{x}{750} \left( 1 - \frac{x}{750} \right)$$

for DGE patterns.  $C$  and  $C'$  were constants of normalization and  $x$  indicates the number of scans.

### Measurement of peak and background areas and identification of true units within a pattern

True peaks were defined as unit(s) with a similar single migration coefficient (one Gaussian curve) whereas false peaks were defined as units with several migration coefficients (two or more Gaussian curves). True peaks were determined following assumptions from the laws  $F$  and  $G$ . For our purposes, 10 representative points were considered on both sides of a peak. A regression on a linear tendency, added to a Gaussian with unknown variance, was carried out. If the estimate of the variance was equal to or of the same order of magnitude as  $\sigma_0^2$ , the peak was considered to be a single unit. If the estimated variance was definitely larger than  $\sigma_0^2$ , the peak was considered to result from either the contribution of at least two units or from the sum of many subdominant units. The highest peak was considered as the most frequent unit. Its abundance within the SSCP pattern was measured as the ratio between the area of the peak and the total area of the pattern.

The estimate of the subpeak background signal area was based on the smoothing of a piecewise linear curve which joined the different minima of the SSCP pattern.

### Measurement of the diversity using a Curtis estimator

The number of species  $S_T$  was estimated following the method of Curtis and colleagues (2002) with the following assumptions: distribution law  $G$  was lognormal and the least frequent unit only contained one or at most two units.

The number of individuals in the sample ( $N_T$ ) was either exactly known, as in a simulated pattern (input data), or measured in an experimental pattern. In the latter case,  $N_T$  was approximated as the number of bacterial genomes in the sample before PCR amplification. The DNA concentration was estimated by agarose gel electrophoresis and the number of genomes calculated assuming 2 Mb per bacterial genome (Button and Robertson, 2001).

The final parameter, the number of individuals in the most frequent units or phylotype ( $N_{\max}$ ), was obtained in different ways: (i) in simulated patterns,  $N_{\max}$  was exactly known from input data, (ii) in simulated patterns,  $N_{\max}$  was approximated as

$$N_{\max} = \frac{n_{\max}}{n_T} N_T$$

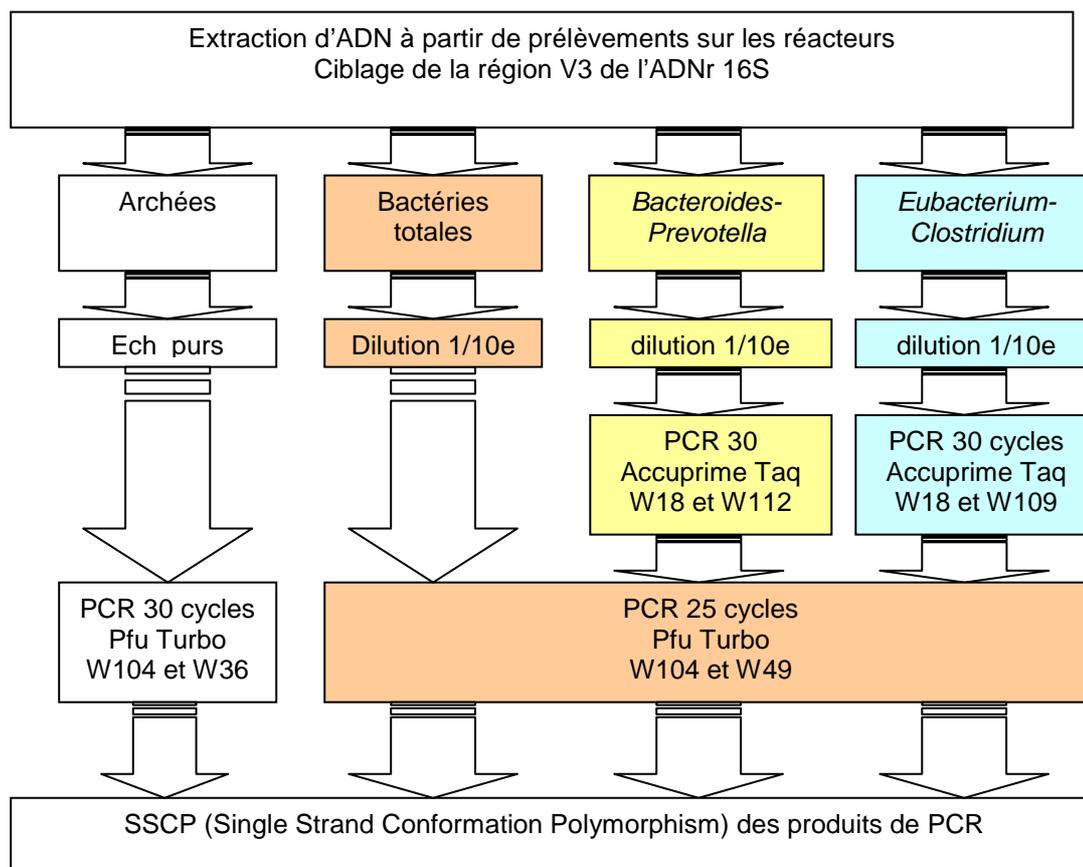
and (iii) in simulated and experimental patterns,  $N_{\max}$  was measured from the pattern and approximated using the same equation.

## Acknowledgements

We would like to thank P. Dabert and J. Hamelin for helpful discussion. Thanks also to D. Bougard, J. Doré, M. Larcher, P. Lebaron, P. Peu, R. Snell Castro and G. Vourc'h for DNA samples.

## References

- Acinas, S.G., Klepac-Ceraj, V., Hunt, D.E., Pharino, C., Ceraj, I., Distel, D.L., and Polz, M.F. (2004) Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community. *Nature* **430**: 551–554.
- Bell, G. (2000) The distribution of abundance in neutral communities. *Am Naturalist* **155**: 606–617.
- Button, D.K., and Robertson, B.R. (2001) Determination of DNA content of aquatic bacteria by flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1636–1645.
- Cases, I., and de Lorenzo, V. (2002) The grammar of (micro)biological diversity. *Environ Microbiol* **4**: 623–627.
- Curtis, T.P., and Sloan, W.T. (2004) Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Curr Opin Microbiol* **7**: 221–226.
- Curtis, T.P., Sloan, W.T., and Scannell, J.W. (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 10494–10499.
- Dabert, P., Fleura-Lessard, A., Mounier, E., Delgenes, J.P., Moletta, R., and Godon, J.J. (2001) Monitoring of the microbial community of a sequencing batch reactor bioaugmented to improve its phosphorus removal capabilities. *Water Sci Technol* **43**: 1–8.
- Dabert, P., Delgenes, J.P., and Godon, J.J. (2005) Monitoring the impact of bioaugmentation on the start up of biological phosphorus removal in a laboratory scale activated sludge ecosystem. *Appl Microbiol Biotechnol* **66**: 575–588.
- Dahllof, I., Baillie, H., and Kjelleberg, S. (2000) rpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3376–3380.
- Diez, B., Pedros-Alio, C., Marsh, T.L., and Massana, R. (2001) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2942–2951.
- Dunbar, J., Bams, S.M., Ticknor, L.O., and Kuske, C.R. (2002) Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3035–3045.
- Fromin, N., Hamelin, J., Tamawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., et al. (2002) Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ Microbiol* **4**: 634–643.
- Godon, J.J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., and Moletta, R. (1997) Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2802–2813.
- Hughes, J.B., Hellmann, J.J., Ricketts, T.H., and Bohannan, B.J.M. (2001) Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4399–4406.
- Kemp, P.F., and Aller, J.Y. (2004a) Estimating prokaryotic diversity: when are 16S rDNA libraries large enough? *Limnol Oceanogr Methods* **2**: 114–125.
- Kemp, P.F., and Aller, J.Y. (2004b) Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiol Ecol* **47**: 161–177.
- Kowalchuk, G.A., and Stephen, J.R. (2001) Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annu Rev Microbiol* **55**: 485–529.
- Leser, T.D., Amenuvor, J.Z., Jensen, T.K., Lindecrone, R.H., Boye, M., and Moller, K. (2002) Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl Environ Microbiol* **68**: 673–690.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H., and Forney, L.J. (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4516–4522.
- Martin, A.P. (2002) Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3673–3682.
- Muyzer, G., and Smalla, K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**: 127–141.
- Nakatsu, C.H., Torsvik, V., and Ovreas, L. (2000) Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Sci Soc Am J* **64**: 1382–1388.
- Narang, R., and Dunbar, J. (2004) Modeling bacterial species abundance from small community surveys. *Microb Ecol* **47**: 396–406.
- Ovreas, L., and Torsvik, V. (1998) Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microb Ecol* **36**: 303–315.
- Pace, N.R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**: 734–740.
- Ranjard, L., Poly, F., Lata, J.C., Mougel, C., Thioulouse, J., and Nazaret, S. (2001) Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4479–4487.
- Schmalenberger, A., and Tebbe, C.C. (2003) Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies. *Mol Ecol* **12**: 251–261.
- Snell-Castro, R., Godon, J.-J., Delgenes, J.-P., and Dabert, P. (2005) Characterisation of the microbial diversity in a pig manure storage pit using small subunit rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Ecol* **52**: 229–242.
- Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J.J., Gibson, G.R., Collins, M.D., and Dore, J. (1999) Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* **65**: 4799–4807.
- Suzuki, M., and Giovannoni, S. (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol* **62**: 625–630.
- Zhou, J., Xia, B., Treves, D.S., Wu, L.-Y., Marsh, T.L., O'Neill, R.V., et al. (2002) Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Appl Environ Microbiol* **68**: 326–334.

**V.8. Annexe 7 : Amorces utilisées pour la SSCP**

Groupe	PCR spécifique du groupe	pol	PCR de la région V3	pol
Bactéries totales	-			
<i>Bacteroides-Prevotella</i>	W18 (position 9) 5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' W112 (position 887) 5'-TCACCGTTGCCGGCGTACTC-3'	Accuprime Taq	W104 (position 533) 5'-6FAM-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3' W49 (position 330) 5'-ACGGTCCAGACTCCTACGGG-3'	pfu
<i>Eubacterium-Clostridium</i>	W18 (position 9) 5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' W109 (position 561) 5'-CCCTTTACACCCAGTAA-3'	Accuprime Taq		
Archées	W36 (position 333) 5'-TCCAGGCCCTACGGGG-3' W104 (position 533) 5'-6FAM-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'	pfu	-	

## **V.9. Annexe 8: SAFUM v4.3 MANUAL**

### Overview

Safum is intended to help all molecular biologists that use the ABI sequencer for fingerprinting techniques. It is a user-friendly Matlab script that performs classical analysis on fingerprints to provide a useful output for further analysis or presentation of the data. However, the statistical analyses are not exhaustive, for example non Metric Multi Dimensional Scaling is not available yet. The purpose of this software is to perform very rapidly the most common analysis (dendrogram, PCA) and to provide user-friendly data, that can be imported into other software for further analysis.

This manual is meant to be used with Safum version 3.2. Me and my colleagues will be happy to help you if you encounter any problem (Safum@gmail.com). This program has been running for one year in the lab with Matlab version 6.5.

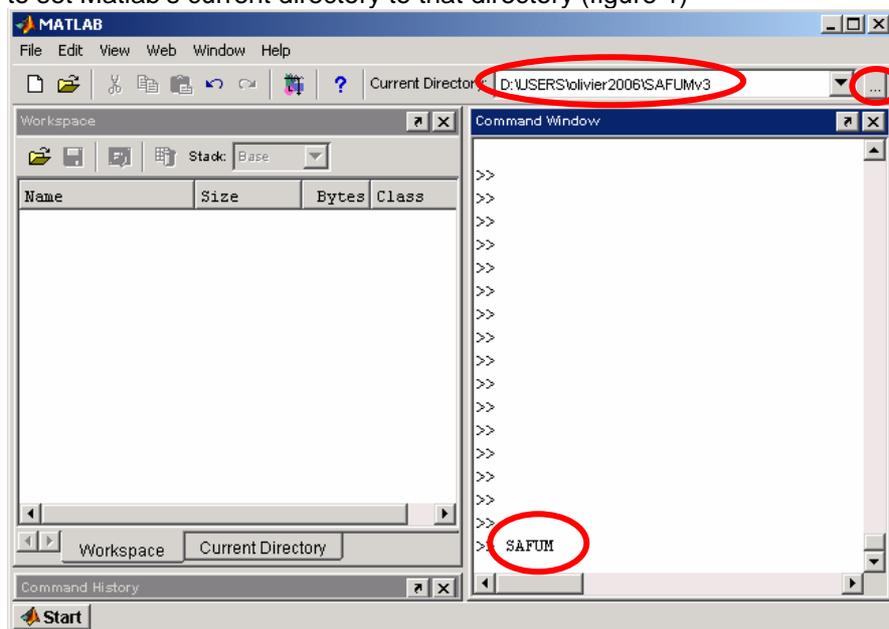
### **V.9.1. WHAT DO I NEED TO RUN SAFUM?**

#### *V.9.1.1. What toolboxes ?*

To run Safum with full option you will need Matlab 6.5 with the statistical toolbox. Safum is a matlab script, and therefore can be run with PC or MAC.

#### *V.9.1.2. HOW DO I START SAFUM, once Matlab 6.5 is installed on my computer?*

You need to copy the Safum file (or unzip the zip file) in any directory that you choose. Then you have to set Matlab's current directory to that directory (figure 1)



**Figure 1:** Once you have copied and/or unzipped SAFUM in a folder, you have to select this folder as current directory so that Matlab knows what script has to be launched when you type "Safum". To do this, browse your disc with the button on the upper right corner.

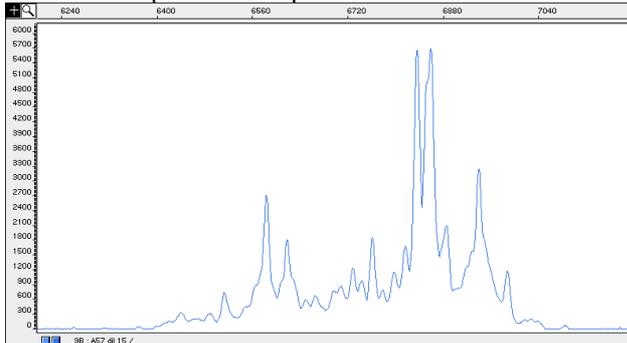
### **V.9.2. IMPORTATION OF DATA FROM AN ABI SEQUENCER**

### V.9.2.1. IMPORTATION from an image

The first way to import data from the sequencer uses the graphical display of Genscan or Genemapper. Even though this is a very basic way to import data, it's very robust and compatible with all version of software.

#### a) Screenshot of the fingerprint

Display on profile at the time in full screen mode and save the screenshot as a gif or bmp file (figure2). For practical reason, we recommend screencatcher , or any software with a shortcut key to capture the same espace in a repetitive manner.

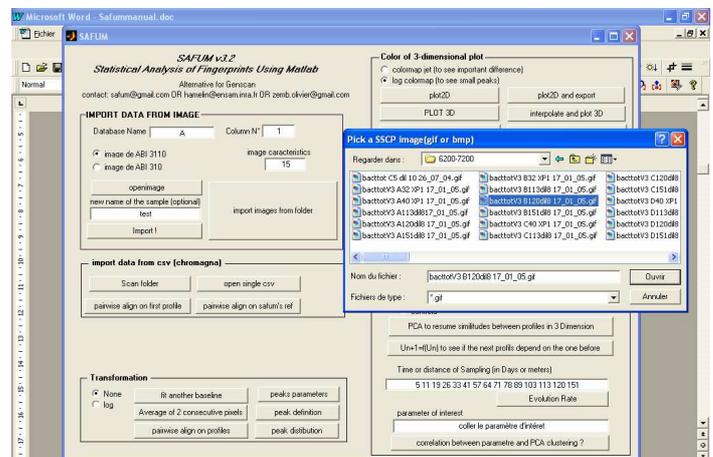


**Figure 2:** Screenshot of an SSCP profile generated by an ABI 310. SAFUM find the black sides of the white region, and then converts the blue line in a vector, which area is normalized to one.

#### b) Importation of the screenshot in Matlab and conversion into a vector

**Figure 3** shows an example of a one by one image import (open image, enter the name of the image if you want to change it, and press import).

More convenient is the 'scan folder' button. This opens a window, which allows you to select the file you want to scan. Matlab looks in this folder for image files and imports them using their windows name. Note that this name can be changed afterwards using excel. Matlab automatically detects the black delimitation of the image, using the gif color code. However, this automatic detection might fail for some image (due for example to PC/Macintosh compatibility).



### V.9.2.2. IMPORTATION from an fsa

#### file

The second way to import data uses the fsa output file from the ABI sequencer. This requires two steps. The first step is to export the fingerprint and the internal standard into excel files. The second step is to align these fingerprints on the same standard.

#### a) Install Chromagna

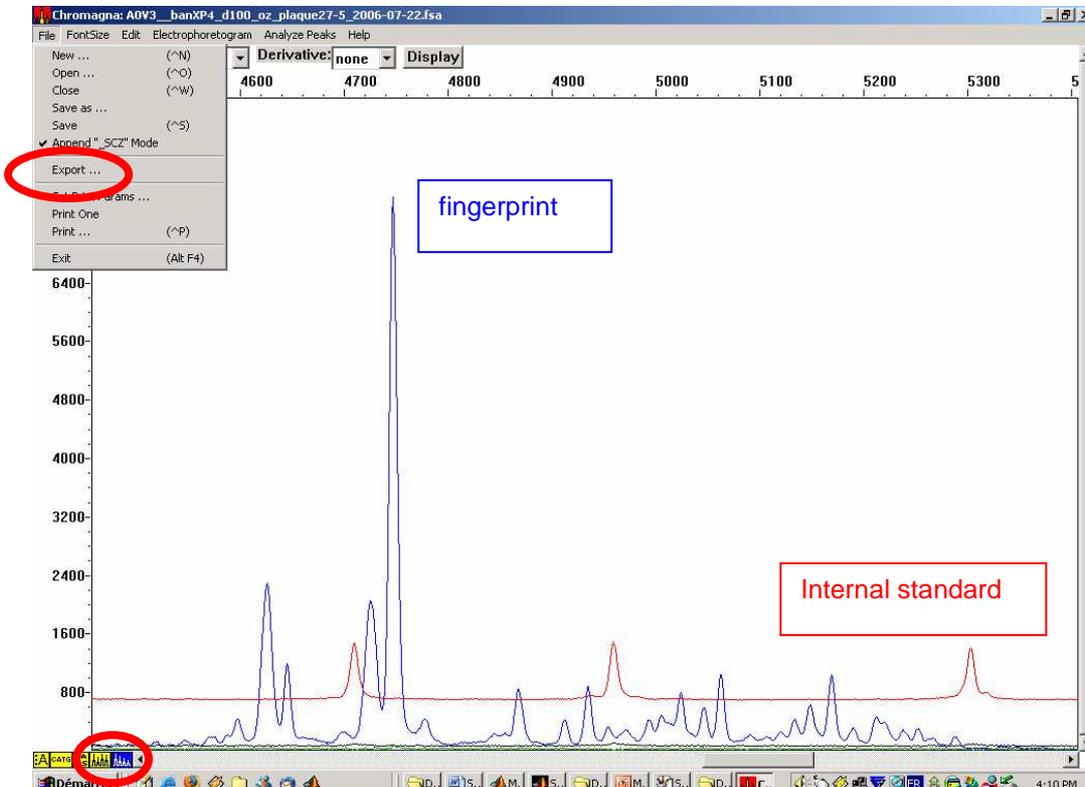
You have to contact mark miller ([millerm@dc37a.nci.nih.gov](mailto:millerm@dc37a.nci.nih.gov)). He provides one of his program, called chromagna.

#### b) Convert fsa file into csv using Chromagna

Mark Miller kindly has provided us with his software, Chromagna. This software is able to open fsa files and export the data into excel files. You have to contact him to use his software.

Note that two different data are present in the fsa file: the raw data and the filtered data. We are interested in the filtered data (where any contamination of the red signal has been subtracted of the blue signal, contamination of the blue signal has been extracted from the red signal...). Depending on the machine, this is obtained with the right or the left button in the lower left corner.

The export option of the Chromagna software allows us to export the data to an excel file. (Figure 4)



**Figure 4:** Conversion of fsa file into a csv file, which can be imported in Matlab for alignment.

The sequencer records the intensity on four channels: Blue, green, yellow and red. The raw signals have to be "separated" because a blue fluorophore as FAM may sort on both the blue and the red channel. The separated signals have to be exported in CSV file.

Some slight difference in the way of exporting the separated signals might happen depending on the sequencer that is used. For example, Chromagna provides separated signals with ABI Prism 3100, can provide separated signal or raw signals from samples of ABI Prism 310 that have been analyzed and only raw signals from samples that of ABI Prism 310 were not analyzed with Genscan®. This might be a problem. If you have a few fsa file with only raw signals, we suggest that you either:

- Analyze them with Genscan. Note that you don't have to use the same parameters for analyzing them as the rest of the samples. This might be convenient, as it is sometimes difficult to analyze all samples from a study with the sample parameter. The choice of the analysis parameter of Genscan has no influence.
- Multiply the raw signals with the matrix of your sequencer, in order to separate the signals.

### c) Import csv file into Matlab

The 'scan folder' button in the 'import data from csv' window is used to perform this step. This opens a window, where you select the folder containing the files that you want to scan. Matlab then imports the csv files, keeping their windows name. Note that this name can be change afterwards using excel.

### V.9.2.3. Alignment of fingerprints using the internal size standard

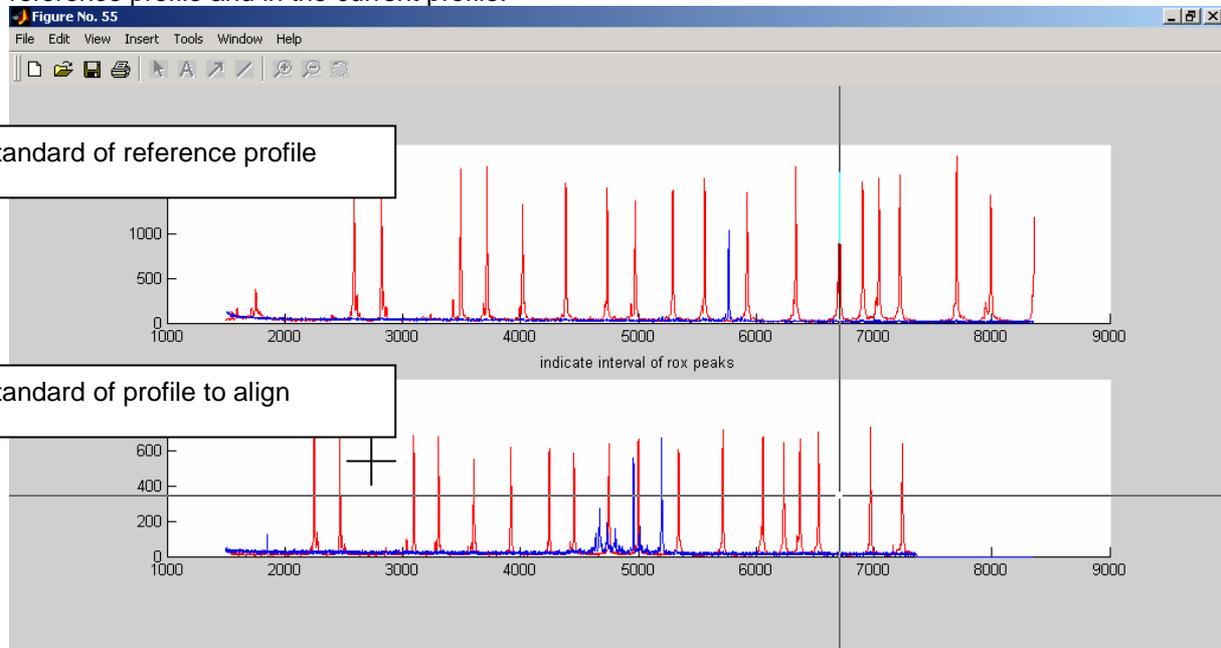
Once the profiles are imported into Matlab, they have to be aligned. They are two ways of doing this:

#### a) Alignment using the first profile as the reference

The first profile is arbitrary taken as reference. The internal standard peaks (for example Rox in SSCP fingerprints) of the first profile are taken as size reference and then all further profiles standard peaks will be aligned to those of the first profile.

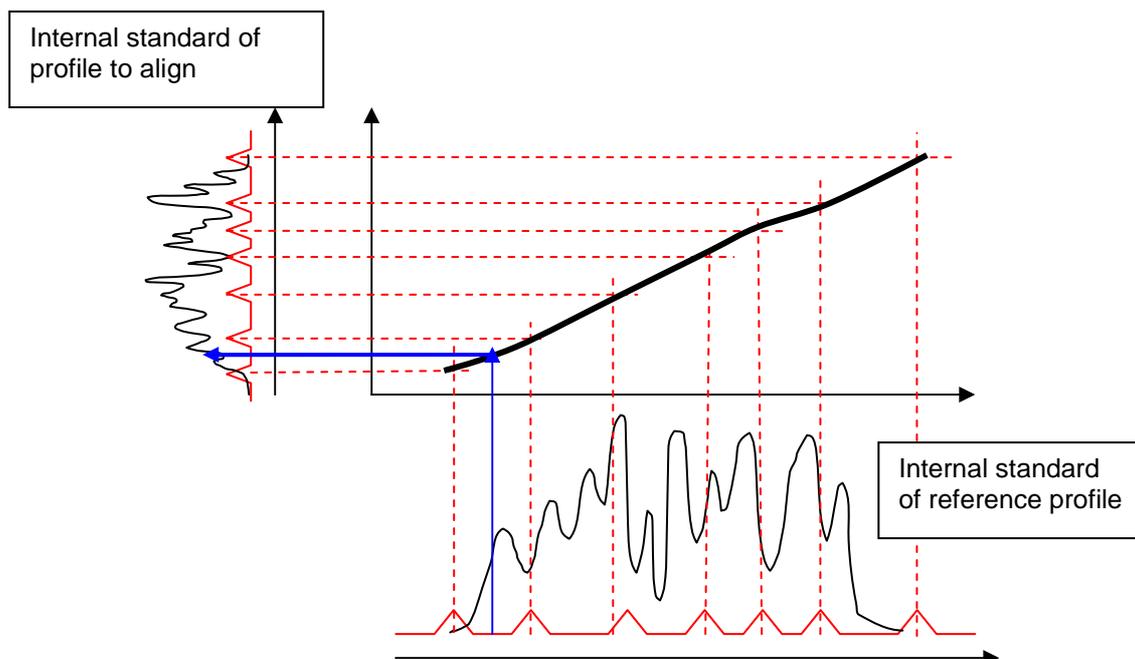
For each profile, the user defines the region to be compared and the fluorescence threshold by positioning the cursor at the beginning and at the end of the region desired.

Matlab then align the standard peaks higher than the threshold in the user-defined region. If the automatic detection fails, the user is invited to select manually each peak of the standard in the reference profile and in the current profile.



**Figure 5:** Selection of the interval to align. Matlab detects internal standard peaks on this interval for each profile. Should this automatic detection fail, user is invited to define these standard peaks manually for this sample. The analysis then switches back to automatic mode.

The profile is then interpolated on the standard of the first profile. This allows to exactly align the standard, with can be problematic with Genscan (Figure 7).



**Figure 5bis:** Principle to align profiles, based on the internal standard. For each value of the reference profile, Matlab interpolate the value of the profile to align (blue arrow), even if the migration of the latter was slightly different.

#### b) Alignment using the safum standard

The file 'roxref.csv' contains a profile that the user considers as reference. The peaks of this profile are used to every alignment. This is used when many different samples need to be compared, and not necessarily at the same time.

For each profile, the user defines a working interval and a threshold by using the cross hair.

Matlab takes into account the working interval that the user defines for each profile and detects the standard peaks higher than the threshold.

The profile is then interpolated on the standard of the profile contained in 'roxref.csv'. This allows to exactly align the standard, with can be problematic with genscan. Should the automatic detection fail, the user is invited to define each peak of the standard in the reference profile and in the currently working profile.

#### V.9.2.4. Setting the Baseline and region of interest

At the end of the alignment, a new window opens. This window displays the detected internal standard peaks (numbered crosses). The user then has to click four times in regions where no signal appears (see figure 6). The signal between the clicks 1-2 and the clicks 3-4 is used to set the baseline. The region between the standard peak after second and before third click is retained.

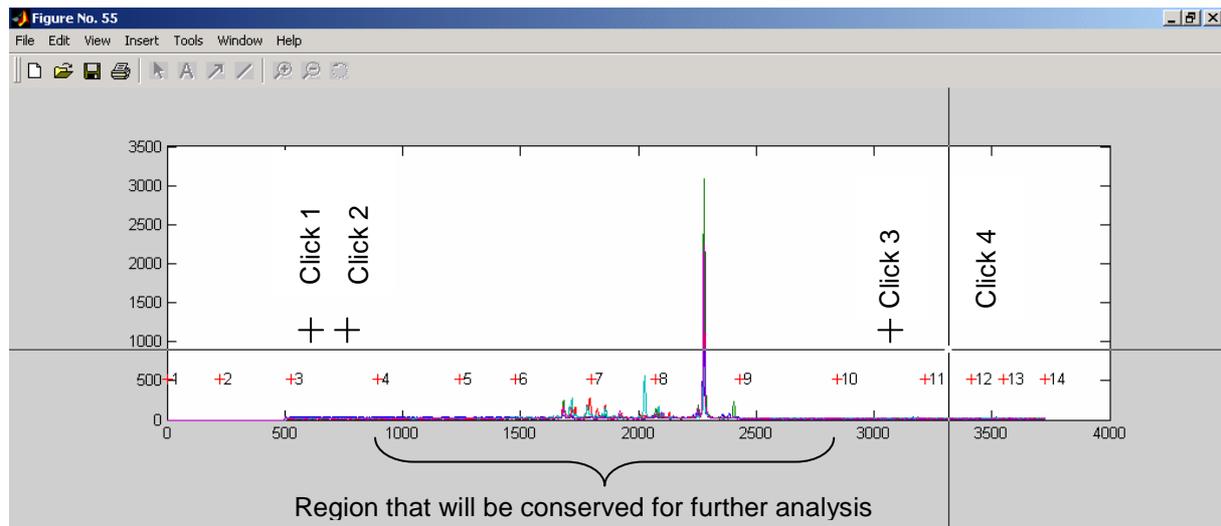


Figure 6: Baseline and determination of the work region of interest of the aligned profiles

### **V.9.3. DATA MANAGEMENT**

#### *V.9.3.1. Saving the aligned profiles database*

After the data have been imported, the user is highly advised to save his data. They should be saved by one of the following ways:

- a) Save data in Matlab format

The data can be saved as a matlab database by clicking ‘save database’

- b) Save data with Excel format

Alternatively, the data can be exported to excel by clicking ‘spreadsheet export’ . The samples are stored in columns. The first cell is the name of the sample. This option is also very convenient to change samples names or to suppress some sample from the database.

#### *V.9.3.2. Importing the aligned profiles database*

- a) Data in Matlab format

The user can import previously saved Matlab data by clicking “load database” (figure 9)

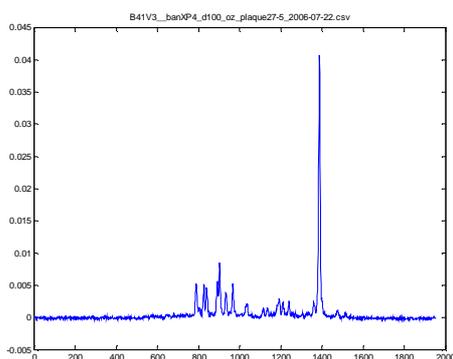
- b) Data in excel format

The user can import previously saved excel data by pressing ‘spreadsheet import’ (figure 9). The samples are stored in columns. The first cell is the name of the sample.

### **V.9.4. DATA VISUALIZATION**

#### *V.9.4.1. Plot 2D*

To check rapidly each profile, clicking on 2D plot button will display each profile in a separate window. Additionally, the graphs can be automatically saved in the current directory by clicking on the ‘2Dplot and export’



**Figure 7:** Example of 2D plot, exported with emf format (enhanced metafile).

#### *V.9.4.2. Plot3D*

To visualize several profiles at the same time, Matlab is able to stack the profiles one after the other. This is particularly useful in the case of time series. The button allows the user to choose a



## V.9.5. DATA TRANSFORMATION

### V.9.5.1. Baseline redefinition

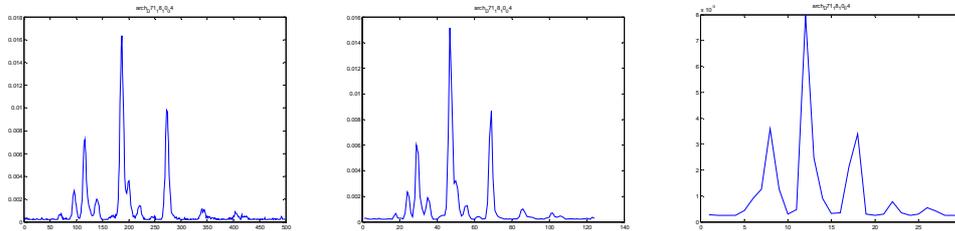
The baseline might not be optimal for samples with migration problems. Therefore, it is possible to redefine the baseline of a database of fingerprints. However, doing this too often might generate some artifacts.

### V.9.5.2. Migration Problems (even if the internal standard is aligned)

Sometimes, even if the internal standard perfectly matches, there's still a slight deviation between the profiles that should be the same. In this case, SAFUM offer two possibilities:

#### a) Average of two consecutive scans

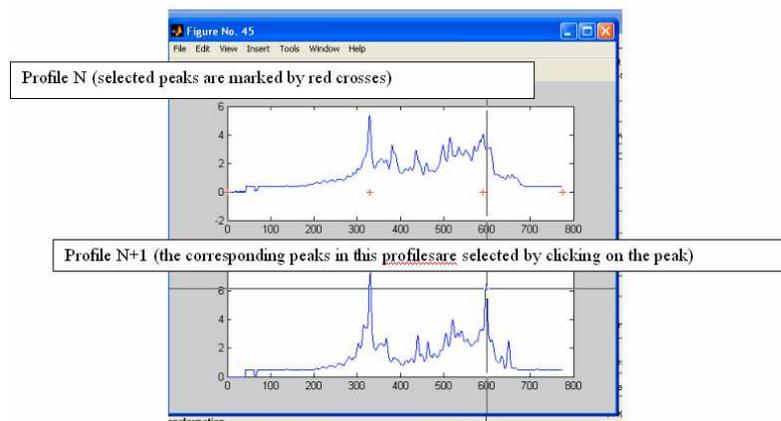
The simplest way to fix the problem of slight shifts is to regroup scan with his neighbor. (Figure 9) Although this is rapid, this can only fix very minor problems.



**Figure 9:** An Archea profile after 1,3 and 5 averages. As can be seen from the evolution of A to C, the resolution decreases. This process should only be used once to fix minor shifts. Note that these shifts are sometimes present, even though the internal standard matches perfectly.

#### b) Peak alignment

To fix bigger shifts, the user is invited to compare profiles pair wise and to manually select the corresponding that are considered to be identical. The same algorithm used for internal standard alignment is then used to force alignment of the two profiles. Using this assumption, the peaks then perfectly match (figure 10).



**Figure 10:** the user considers the profile N with the profile N+1. He clicks on those peaks that he wants to fit because he assumes that they are the same. These peaks are aligned, using the same methods than for the internal standard. Once this alignment is achieved, the user will be asked to align the profile N+2 with the profile N+1 he just aligned.

### V.9.5.3. Amplification of the small peaks

A commonly used transformation on relative abundance in macro ecology is to calculate similarities on the logarithm of relative abundance. The user may use this option to decrease the weight of high peaks (i.e. dominant species). However, interpretation has to be done accordingly.

## V.9.6. DATA STATISTICS

### V.9.6.1. Export distance or similarity matrix from all profiles

The Euclidean distance is the area that differs between two profiles. The more the profiles differ, the more this area is important.

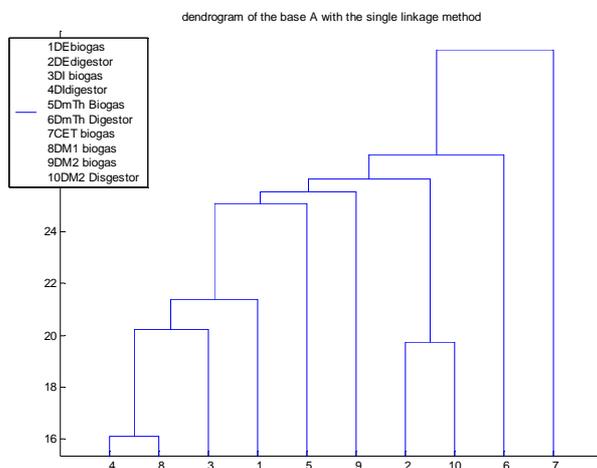
The distance between the profile j and the profile k is defined as:  $d_{jk} = \sqrt{\sum_{i=1}^p (y_{ij} - y_{ik})^2}$  where  $y_{ij}$  is the  $i^{\text{th}}$  value of the profile j and  $y_{ik}$  is the  $i^{\text{th}}$  value of the profile k

The distance matrix may be exported into excel .

The similarity matrix ( $s_{jk} = 1 - d_{jk}$ ) may also be exported.

### V.9.6.2. Dendrogram

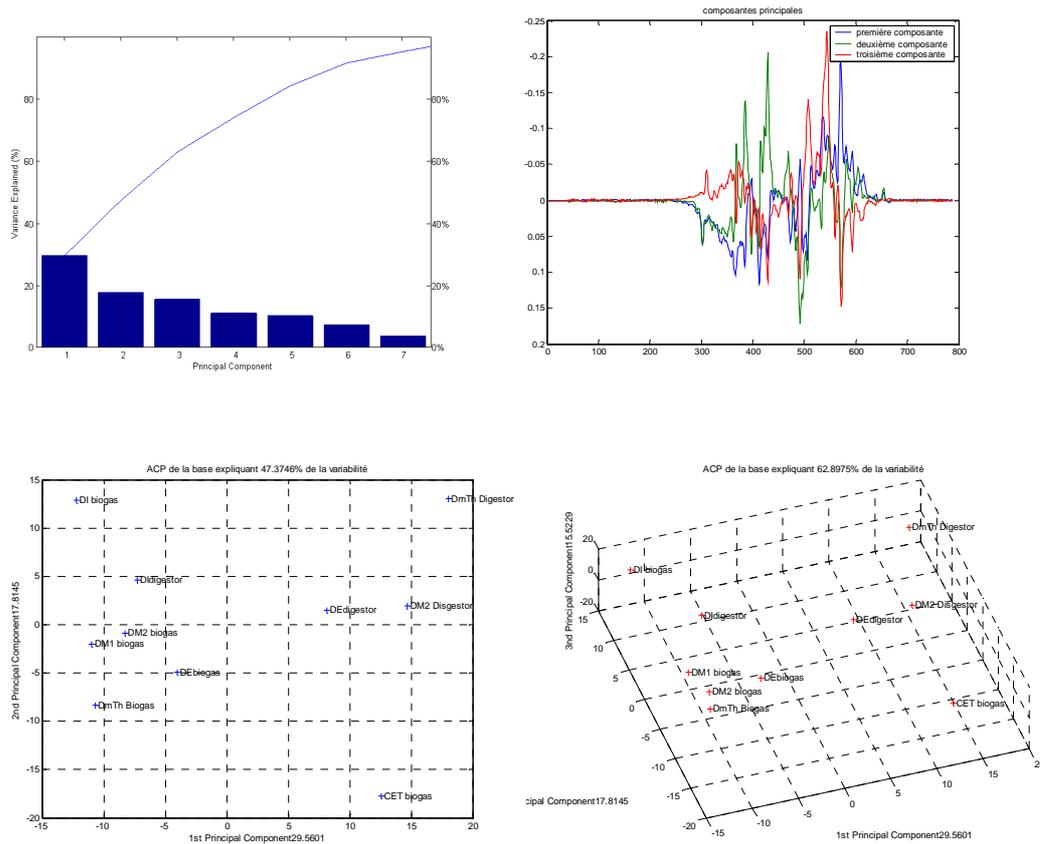
To compare the similarity between a few profiles, the use of dendrogram is very practical. All dendrograms made with Safum use the previously described Euclidean distance. Once this distance was calculated, several methods are available to cluster the samples. Briefly, some are more appropriated to compare samples from gradients (single linkage method) whereas others are more efficient to illustrate divergence in the data. Borcard, D., P. Legendre & P. Drapeau. 1992. Partialling out the spatial component of ecological variation. Ecology 73: 1045-1055. (figure 11).



**Figure 11:** Dendrogram of SSCP profile with the single linkage method, based on the Euclidean distance. Samples were collected in anaerobic digesters or in the biogas above these digesters. Other methods of dendrogram construction are available in SAFUM. All of them use the Euclidean distance.

### V.9.6.3. Principal Component Analysis

To compare similarity between numerous profiles, PCA is more adapted than dendrogram. It is possible to do this PCA directly and rapidly with Safum. All classical graphs are displayed. A three dimensional PCA is also displayed because the breakdown in variance explanation (pareto plot) often happen to be after the third axe (figure 12).

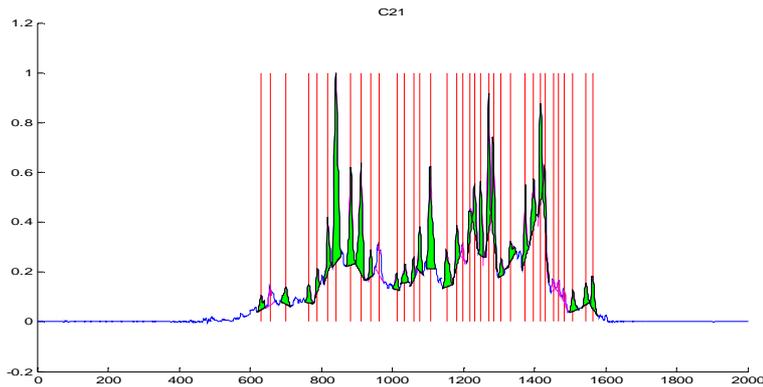


**Figure 12:** Typically, SAFUM displays the represented variance for each axe, the principal component vector, and the samples 2D and 3D representation. In this example, we can see that most biogas samples are similar on this representation. But, PCA represents only a part of the data. It is possible to see what is exactly represented.

#### V.9.6.4. Detection of the “real peaks”

In complex ecosystems, the overlapping of many species can lead to a background and to larger peaks (that do not correspond to species). One possibility is to do a convolution (with a user defined standard deviation) to find the peaks. If the deviation of the peak is higher than this user-defined value, several species are probably contributing to this peak.

The other possibility is to define a rolling ball (with a user defined radius). If the peak is due to one phylotype, the ball will not roll in the peak, leaving an area representative of unique phylotype, so colored in green. The user can also defined a threshold for this area (Figure 13)

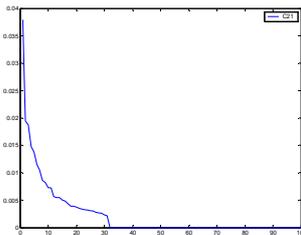


**Figure 13:** SAFUM detects the peaks with a rolling ball. He places a red bar. Peaks that are too large are not considered as “single-specie” peaks, and therefore are not colored in green. Peak detection parameters are user defined and depend from the fingerprinting machine.

#### V.9.6.5. Relative area of the “real peaks”

Peaks (defined as above) can be exported under excel. This might be useful to study the distribution law of the most abundant species if they are distinguishable from the background.

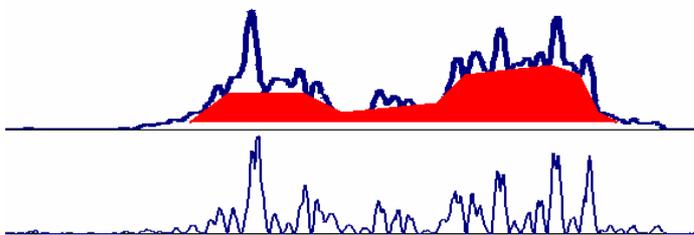
Distribution of peaks (defined as above) can be exported under excel. This might be useful to study the distribution law of the most abundant species if they are distinguishable from the background (Figure 14).



**Figure 14:** Distribution of relative area of the peaks. The relative area is normalized so that  $\sum a_p + \text{background} = 1$  where  $a_p$  are the peaks area.

#### V.9.6.6. Export the background area from all profiles

The background contains information (figure 15). It is often cut off, especially in gel fingerprints. The background may here be exported. For analysis details, please refer to Loisel et al., 2006)



#### V.9.6.7. Detail of particular profiles

Sometimes, it is interesting to compare only a few profiles from the database. This is possible with the ‘select some profiles to perform analysis’ button.

The names of the profiles are displayed. The user selects by clicking the profiles of interest and presses "enter". Further analyses are performed as described above.

---

## Glossaire

AGV, FVA : les Acides gras Volatils (ou Fatty Volatil Acids) sont des intermédiaires de digestion anaérobies. Ils proviennent de l'hydrolyse et de l'acidogénèse de molécules organiques complexes et sont minéralisés en méthane et dioxyde de carbone par les archées.

Band, peak : correspond respectively to visible elements within experimental or simulated DGE and SSCP patterns

Biocénose (ou consortium) : ensemble des organismes vivants d'un système.

Connectance : caractérise le nombre de connections entre les objets d'un système

DGE : empreintes moléculaires basée sur un gradient dénaturant (DGGE, TGGE, TTGE)

Diversité : Dans la littérature, la diversité peut signifier la richesse spécifique, la variété de métabolismes au sein d'une espèce ou encore la variabilité des phénotypes au sein d'une population.

Drogue : Substance qui, injectée dans une bactérie, produit un article scientifique

Ecosystème : au sens large, c'est la somme de la biocénose et du biotope.

Enveloppe d'amplification : C'est la fonction qui donne l'évolution au cours du temps après un choc de la variable décrivant l'objet considéré. Cette courbe peut être résumée en un certain nombre de points caractéristiques.

Flocs : bactéries agrégées en ensemble cohérent pouvant aller de quelques microns à plusieurs centaines de microns.

$N_{max}$  : number of individuals in the most frequent units or phylotype in the experimental or simulation sample

$n_{max}$  : number of individuals in the most frequent units or phylotype in the cloning sample or SSCP pattern

$n_T$  : number of individuals in the cloning sample or SSCP pattern

$N_T$  : number of individuals in the experimental or simulation sample

Résilience : Retour à l'état initial après un choc. Elle peut être utilisée pour des populations ou pour un flux. Elle peut être mesurée de différentes manières (cf. I).

Richesse spécifique : nombre d'espèces présentes dans le système.

SIP : « Stable Isotope Probing », technique permettant de suivre l'assimilation d'un isotope lourd dans l'ADN, et donc d'accéder à l'identité des micro-organismes actifs

SSCP, single Strand conformation Polymorphism : technique d'empreinte moléculaire. En première approximation, chaque espèce équivaut à un phylotype, qui est caractérisé par un temps de rétention.

$S_T$  : number of units or phylotype within in-silico and experimental patterns, respectively

Structure microbienne : Abondance relative de différents groupes microbiens

SWB : « SeaWater broth », Milieu de culture à base de peptone et d'extraits de levure en faible concentration

Système : ensemble d'objets liés entre eux par des relations. Un système est délimité par une barrière physique ou imaginaire.

Unit : in-silico pattern counterpart of a phylotype from an experimental pattern

Valeur de consigne : Valeur de référence d'une variable décrivant le système lorsqu'il est à l'équilibre

---

## Résumé général

Traditionnellement, beaucoup de travaux visent à augmenter la productivité d'un écosystème en adoptant une gestion appropriée. Récemment les écologues se sont penchés sur une autre caractéristique très utile du fonctionnement de l'écosystème : La stabilité du fonctionnement en cas de choc. Un système qui retourne rapidement à son état initial après une perturbation est dit fortement résilient.

Certaines caractéristiques semblent spécifiques des écosystèmes fortement résilients : Un grand nombre d'espèces, la présence de certaines espèces clés, une forte productivité, la dégradation en parallèle d'une source de carbone, une chaîne trophique courte ou la capacité d'utiliser efficacement différentes sources de carbone.

Cependant, les moyens d'action pour augmenter la résilience d'un système à partir de paramètres sous contrôle de l'homme restent largement méconnus. Plusieurs études suggèrent que les fluctuations de l'environnement structurent la communauté d'organismes d'un écosystème, rendant un système évoluant dans un environnement fluctuant différent d'un système évoluant dans un environnement stable. Elles peuvent sélectionner des stratégies de survie au niveau individuel, des phénotypes particuliers au sein de chaque espèce ou des voies de dégradation au sein de l'écosystème. On peut considérer que c'est la communauté dans son ensemble qui s'adapte aux fluctuations de l'environnement et en conserve la mémoire. Par conséquent, une communauté adaptée à un environnement fluctuant ou à un environnement stable pourraient présenter des résistances différentes (choc que peut encaisser le système) et/ou des résiliences différentes (temps de retour après une perturbation).

Les systèmes microbiens s'avèrent des modèles particulièrement intéressants pour tester cette hypothèse car en plus de représenter un enjeu économique, ils sont facilement manipulables et observables pendant un grand nombre de générations. Dans ma thèse, j'ai comparé la réaction à une perturbation de systèmes microbiens adaptés à un environnement fluctuant et de systèmes adaptés à des environnements stables. J'ai choisi pour cela une même fonction (assimilation de carbone organique) dans deux environnements très différents : le milieu marin et les stations d'épurations. Le premier résultat est qu'un environnement fluctuant sélectionne des organismes particuliers (pas obligatoirement plus divers), même avec des fluctuations de petite amplitude. De plus, les organismes sélectionnés ne sont pas exactement les mêmes dans deux systèmes conduits de la même façon. La sélection n'est donc pas entièrement déterministe. La deuxième constatation est que certaines espèces semblent jouer un rôle majeur après un choc, surtout dans les communautés bactériennes marines. Enfin, les systèmes « perturbés » retournent plus lentement à leur fonction d'origine (moins résilients) mais sont moins robustes en cas de choc (plus résistants). On peut donc s'interroger sur la pertinence de conserver des paramètres physiques stables pour les systèmes que l'on souhaite fiables.

---

**L'écosystème a-t-il une mémoire ?**  
**Importance de l'histoire sur la résilience fonctionnelle de communautés**  
**bactériennes hétérotrophes marines et anaérobies**

---

RESUME

---

Nous voulons déterminer si la résilience (définie comme retour à l'état initial après un choc) de consortia microbiens complexes dépend d'une adaptation physiologique et/ou structurelle aux fluctuations environnementales biotiques et abiotiques.

Nous avons suivi la minéralisation de la matière organique ainsi que la structure des communautés par empreinte moléculaire dans des chemostats.

Il en ressort que les consortia de bactéries marines prélevées sur le littoral ou au large n'ont pas la même résilience fonctionnelle après un choc de toluène. La résilience semble dépendre des propriétés physiologique d'une souche d'*Alteromonas*/ ubiquiste.

D'autre part, les fluctuations environnementales sélectionnent des communautés anaérobies. La fonction de ces communautés est écologiquement plus résiliente après un choc acide.

Cependant, des chemostats identiques divergent au cours de l'incubation. La sélection n'est donc pas entièrement déterministe.

---

SUMMARY

---

Our goal was to determine if the resilience (defined as the return to an initial state after a shock) of complex microbial communities depends on a physiological and/or structural adaptation(s) to biotic and abiotic environmental fluctuations.

Using chemostats, we monitored the organic matter mineralisation simultaneously with the community structure by molecular fingerprinting techniques.

We found that marine bacterial communities originating from littoral or offshore waters did not have the same functional resilience after a toluene shock. Their resiliences may depend on the physiological properties of a common culture of *Alteromonas*.

In contrast, the environmental fluctuations select anaerobic communities. The dynamic functioning of these communities is ecologically more resilient after an acid shock.

However, identical chemostats diverged over the course of incubations. The selection is, therefore, not entirely deterministic.