

Populations bactériennes dénitrifiantes dans les eaux et sédiments du bassin de la Seine

Céline Roose-Amsaleg^{*}, Josette Garnier, Anniet Laverman

UMR Sisyphe 7619, Fonctionnement des Hydrosystèmes, Université Pierre et Marie Curie-CNRS, Boite 105, Tour 56, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France

^{*}celine.amsaleg@upmc.fr

1 Introduction

Le bassin de la Seine est particulièrement soumis à la pollution azotée, du fait d'une agriculture intensive et d'une anthropisation soutenue. Dans un bilan récent, Thieu *et al.* (2009) font état d'un apport au bassin variant de 70 à 3961 kg d'azote par km² par an (selon que l'année est sèche ou humide) d'origine diffuse agricole et 553 kg N/km²/an d'origine urbaine ponctuelle. Cet apport est surtout dû à deux principaux composés azotés inorganiques à savoir les nitrates (NO₃⁻) et l'oxyde nitreux (N₂O).

Les NO₃⁻, principalement issus de la nitrification (i.e. NH₄⁺ → NO₃⁻), sont nuisibles à la santé humaine et vétérinaire et également à l'environnement. En effet, leur accumulation entraîne la contamination des eaux de surface et souterraine dédiées à la consommation, ainsi que l'eutrophisation des écosystèmes aquatiques, y compris de la zone côtière. Le N₂O est un gaz à effet de serre et d'autant plus notoire qu'il a un pouvoir de réchauffement près de 300 fois supérieur à celui du dioxyde de carbone (tout en étant 1000 fois moins concentré) et une persistance de plus de 100 ans dans l'atmosphère. NO₃⁻ et N₂O sont impliqués dans de nombreuses réactions chimiques et/ou biologiques des cycles biogéochimiques mais c'est à la dénitrification que nous avons choisi de nous intéresser dans cette phase du PIREN-Seine, la nitrification ayant été largement étudiée au cours de la phase précédente (Cebren *et al.*. 2003; Cebren *et al.*. 2004; Tallec, 2005; Tallec *et al.*. 2006).

La dénitrification se définit comme la réduction des NO₃⁻ en diazote gazeux (N₂). Si elle est complète, elle consiste en trois modules de réactions catalysées par des réductases. La première étape (NO₃⁻ → NO₂⁻), commune à deux autres processus biologiques majeurs, la réduction dissimilatrice des NO₃⁻ en ammonium (DNRA) et l'assimilation des NO₃⁻, n'est pas spécifique de la dénitrification. L'étape clé de la dénitrification est la réduction du nitrite (NO₂⁻) en oxyde nitrique (NO), réalisée par la nitrite réductase et codée par les gènes *nirK* et *nirS*, deux formes structurellement différentes mais fonctionnellement identiques de cette enzyme. Enfin, la dernière étape (N₂O → N₂) est réalisée par l'oxyde nitreux réductase, codée par le gène *nosZ*. Ainsi, en analysant ces locus, nous pouvons avoir une idée de la structure des populations bactériennes dénitrifiantes impliquées dans le métabolisme du N₂O.

La dénitrification est un processus biologique réalisé par des micro-organismes chemoorganotrophes facultativement aérobiques appartenant à toutes les branches principales de l'arbre du vivant. Ainsi pour étudier les micro-organismes acteurs de la dénitrification, il faut travailler sur les gènes codant pour les enzymes impliquées dans les différents modules de réactions. Par ailleurs, il est à noter qu'un même micro-organisme ne possède pas nécessairement toutes les enzymes de la dénitrification et que les différentes étapes de dénitrification peuvent avoir lieu indépendamment les unes des autres, spatialement et temporellement.

Dans l'objectif d'étudier l'origine et le devenir du N₂O dans le bassin de la Seine, nous avons choisi de nous intéresser aux populations microbiennes dénitrifiantes du phylum des Bacteria, métabolisant le N₂O c'est-à-dire que nous travaillons sur la variabilité spatiale (géographique) des formes des gènes *nirK*, *nirS* et *nosZ* au sein de ces populations.

2 Structure des populations bactériennes par les gènes de la dénitrification

Dans cette étude, des eaux et des sédiments ont été collectés en juillet 2007, dans sept sous-bassins de la Seine à savoir la Blaise, l'Yonne, la Vesle, la Basse Seine, l'Oise, l'axe Marne et le Grand Morin. Par cette vaste campagne de prélèvement, on cherchait à déterminer le potentiel de dénitrification et les productions de N₂O le long du bassin de la Seine (Garnier *et al.*, 2010). Parallèlement, nous avons tenté de caractériser moléculairement les populations bactériennes dénitrifiantes associées.

Les ADN microbiens sont extraits (et purifiés) à partir des sédiments et des eaux de 24 stations différentes (voir la liste dans le *Tableau 1*). Pour les sédiments, il s'agit d'une méthode de lyse mécanique et chimique (avec le kit UltraClean® Soil DNA Isolation de MOBIO) ; pour les eaux, d'une lyse uniquement chimique (avec le kit NucleoSpin® Plant II de Macherey Nagel). Cette étape d'extraction est primordiale pour tout le reste de l'étude car elle va garantir l'amplification des locus ciblés (Roose-Amsaleg *et al.*, 2001). Nous travaillons avec quatre locus différents. L'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S) permet de visualiser la structure des populations bactériennes dans leur totalité (Muyzer *et al.*, 1993). L'ADN codant pour les nitrite réductases (gènes *nirS* et *nirK*) permet d'étudier les populations bactériennes capables de produire du N₂O (Braker *et al.*, 1998; Michotey *et al.*, 2000) et l'ADN codant pour l'oxyde nitreux réductase (*nosZ*) permet d'étudier les populations bactériennes capables de cataboliser le N₂O (Kloos *et al.*, 2001; Throbäck *et al.*, 2004).

Dans un premier temps, nous pratiquons une amplification par PCR de ces locus à partir des ADN microbiens. Les résultats qualitatifs d'amplification sont synthétisés dans le *Tableau 1*. L'ADNr 16S a pu être amplifié de façon très satisfaisante pour l'ensemble des échantillons ; ce qui nous conforte dans l'idée que l'ADN est suffisamment intègre et purifié pour d'autres amplifications. Pour les autres locus, l'amplification dépend de la station avec néanmoins, une amplification plus facilement réalisable dans les sédiments que les eaux (probablement pour des raisons de densité bactérienne supérieure). Le seul locus qui ait posé problème est *nirK* et uniquement pour les ADN issus d'eaux. En effet, ces ADN se sont révélés être réfractaires à toute amplification du gène *nirK*, et ce, malgré plusieurs tentatives et après modification du protocole d'extraction d'ADN (mécanique au lieu de chimique). Il faudra vérifier si cette absence de gène *nirK* dans les eaux prélevées constitue un résultat ou un biais méthodologique. Il pourrait s'agir d'une impossibilité de détection due à une densité trop faible ou à une indisponibilité à l'amplification des ADN cibles ou encore une extraction mal adaptée pour extraire l'ADN des bactéries possédant *nirK* dans ces échantillons. Un rapide recensement de l'origine des séquences bactériennes *nirK* issues de bactéries non cultivées sur le site Functional Gene Pipeline (<http://fungene.cme.msu.edu/>) semble plutôt aller dans le sens d'une faible occurrence de gène *nirK* dans les eaux. En effet, les échantillons environnementaux ayant donné ces séquences sont soit des sols, soit des boues de station d'épuration, soit des eaux usées et non des eaux de rivières, mais après cette première analyse.

Dans un second temps, si la PCR s'avère convenable, elle est dupliquée ou tripliquée, les produits d'amplification regroupés, concentrés et soumis à une DGGE (Denaturing Gradient Gel electrophoresis). La DGGE est une méthode de séparation de produits de PCR de poids moléculaires identiques en fonction de leur capacité à se dénaturer. Les produits d'amplification sont soumis à une électrophorèse en présence de produits dénaturants répartis sous la forme d'un gradient. Ainsi, les différents amplifiats s'échelonnent le long du gel et on obtient des empreintes génétiques moléculaires. Les gels sont numérisés et analysés avec le logiciel Gelcompar® II (Applied Maths). Les pistes de migration de chaque échantillon constituent une entrée dans une base de données et sont comparées de par leur contenu et disposition en bandes. La diversité des bactéries dans les échantillons n'a pas été l'objet de ce travail. Nous nous sommes attachés ici uniquement à comparer les pistes de migration, ce qui revient à comparer la structure des populations bactériennes des sols et des eaux entre elles.

Concernant l'ADNr 16S, les analyses par DGGE ne permettent pas de révéler de tendance, ni de former de groupes d'échantillons. Ce qui était prévisible au vu de la grande divergence d'origine et de propriétés intrinsèques des échantillons d'eaux et de sédiments (voir *Figure 1*).

La méthode DGGE *nirK*, mise au point sur des échantillons marins (Michotey *et al.* 2000), ne semble pas permettre une discrimination satisfaisante des séquences contenues dans nos échantillons. Il est néanmoins possible d'affirmer que les populations bactériennes comparées contiennent des séquences *nirK* très différentes dont nous pouvons avoir un aperçu par le séquençage de trois d'entre elles dans le *Tableau 2*. Ces séquences ont été confrontées à celles des bases de données de séquences par BLAST¹X et BLASTN.

La méthode DGGE *nirS* n'est pas au point à ce jour. Bien qu'un travail important sur le choix des amorces de PCR ait été spécifiquement réalisé avec le logiciel MeltIngeny® (qui permet d'identifier les domaines de point de fusion des séquences), les empreintes moléculaires ne sont pas interprétables.

¹ Basic Local Alignment Search Tool

Programme PIREN-Seine : Populations bactériennes dénitrifiantes

Tableau 1 : Résultats qualitatifs d'amplification par PCR (+ pour une amplification, - pour son absence) par gènes et par matrice (eaux et sédiments prélevés en juillet 2007).

| Stations | Sédiments | | | | Eaux | | | |
|--------------------------------|-----------|-------|-------|----------|-------|-------|-------|----------|
| | nir K | nir S | nos Z | ARNr 16S | nir K | nir S | nos Z | ARNr 16S |
| Sous-bassin Blaise | | | | | | | | |
| Blaiseron | +/- | - | + | ++ | - | - | - | ++ |
| Baudrecourt | + | - | - | ++ | - | - | - | ++ |
| Pont Varin | +/- | - | + | ++ | - | - | - | ++ |
| Ecollemont | + | + | + | ++ | - | - | - | ++ |
| Landricourt | + | + | + | ++ | - | + | - | ++ |
| Sous-bassin Yonne | | | | | | | | |
| Esnon | + | + | + | ++ | - | + | + | ++ |
| Ru des Vignes | + | + | + | ++ | - | + | + | ++ |
| Sous-bassin Vesle | | | | | | | | |
| Vadenay Affluent | + | + | + | ++ | - | - | - | ++ |
| Somme Vesle | + | + | + | ++ | - | - | - | ++ |
| Courmelois | +/- | - | + | ++ | - | - | + | ++ |
| Sous-bassin Basse Seine | | | | | | | | |
| Aval achères/Herblay | + | + | + | ++ | - | + | + | ++ |
| Conflans | + | + | + | ++ | - | + | - | ++ |
| Triel | + | + | + | ++ | - | + | - | ++ |
| porcheville Les Mureaux | +/- | +/- | + | ++ | - | + | + | ++ |
| Sous-bassin Oise | | | | | | | | |
| La Serre | + | + | - | ++ | - | - | + | ++ |
| Hourry | +/- | - | - | ++ | - | +/- | + | ++ |
| Sous-bassin Axe Marne | | | | | | | | |
| Chamouilley | - | - | + | ++ | - | +/- | + | ++ |
| Moncetz | - | - | + | ++ | - | +/- | + | ++ |
| Reuil | +/- | + | + | ++ | - | + | - | ++ |
| Sous-bassin Grand Morin | | | | | | | | |
| Tresmes | +/- | + | + | ++ | - | + | + | ++ |
| Melarchez | + | + | + | ++ | - | + | + | ++ |
| La Loge | +/- | + | + | ++ | - | + | + | ++ |
| Avenelles | +/- | + | - | ++ | - | +/- | - | ++ |
| LeTheil | + | + | + | ++ | - | + | - | ++ |

Programme PIREN-Seine : Populations bactériennes dénitrifiantes

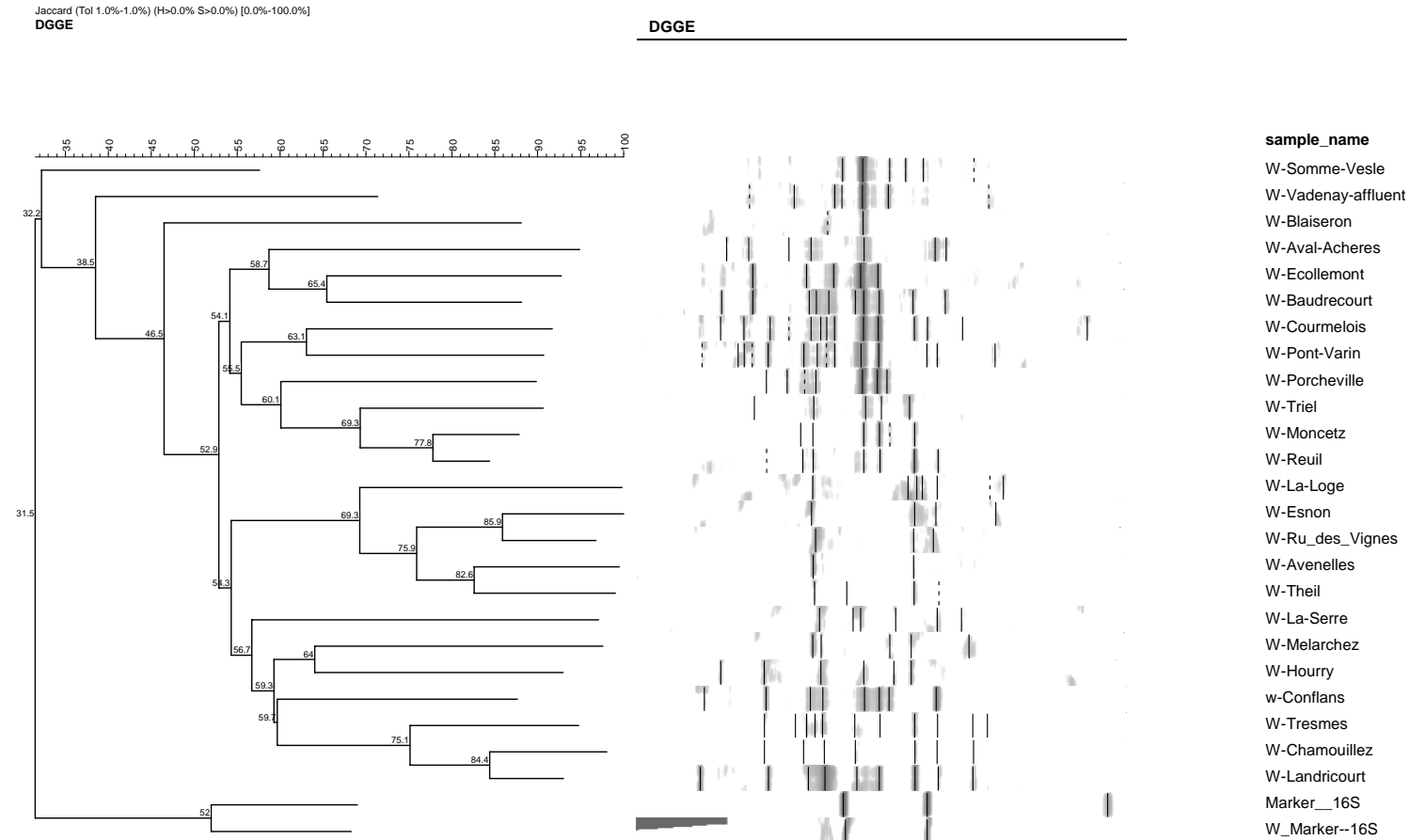


Figure 1 : Comparaison de structure des populations bactériennes totales des eaux du Bassin de la Seine obtenue par DGGE des ADNr 16S

A gauche le dendrogramme (Coefficient de similarité : indice de Dice, méthode de reconstruction : neighbour-joining). ;

au centre, les pistes de gels permettant l'élaboration du dendrogramme, à droite les noms des stations avec Marker_16S, le marqueur de migration utilisé pour « raciner » le dendrogramme

Tableau 2 : Résultats de BLAST X (Search protein database using a translated nucleotide query) confronté à la base « Non redundant protein sequences » du NCBI pour les 3 séquences : plusieurs résultats potentiels de séquences protéiques les plus probables sont donnés étant donné les fortes valeurs de E (« The lower the E-value, or the closer it is to zero, the more "significant" the match is »). Certaines références sont données avec les séquences les plus similaires aux nôtres (voir les notes en dessous du tableau)

Par BLASTN, on n'obtient aucun résultat : "No significant similarity found".

| N° bandes | Taille séquence nucléotidique (pb) | Séquences les plus probables | Expect value (E) |
|-----------|------------------------------------|--|------------------|
| B3 | 449 | nitrite reductase, copper-containing [Mesorhizobium sp. BNC1] ¹ | 1e-51 |
| | | respiratory nitrite reductase [Roseovarius sp. 217] | 1e-50 |
| B10 | 451 | nitrate reductase unculured bacteria ² | 6e-63 |
| | | putative dissimilatory nitrite reductase [Nitrosomonas sp. TA-921i-NH4] ³ | 9e-63 |
| | | putative copper nitrite reductase [uncultured bacterium] ⁴ | 2e-62 |
| B15 | 449 | nitrate reductase [uncultured bacterium] ² | 4 e-61 |
| | | putative copper nitrite reductase [uncultured bacterium] ⁵ | 2e-60 |

¹Complete sequence of chromosome of Mesorhizobium sp. BNC1, Unpublished

²Wolsing, M. and Prieme, A. (2004) Observation of high seasonal variation in community structure of denitrifying bacteria in arable soil receiving artificial fertilizer and cattle manure by determining T-RFLP of nir gene fragments FEMS Microbiol. Ecol. 48 (2), 261-271

³Casciotti, K.L. and Ward, B.B. (2001) Dissimilatory nitrite reductase genes from autotrophic ammonia-oxidizing bacteria Appl. Environ. Microbiol. 67 (5), 2213-2221

⁴Philippot, L. and Henry, S. Diversity, density and activity of nitrate reducers and denitrifiers in soil amended with root exudates Unpublished

⁵Zhang, Y.G., Li, D.Q. and Xiao, Q.M. Molecular diversity of copper-containing dissimilatory nitrite reductase (nirK) gene in Qing-Zang Plateau Unpublished

Concernant le locus *nosZ*, les résultats de DGGE ne semblent pas indiquer de lien entre la matrice (sédiment ou eau) et la structure des populations *nosZ* (Figure 2). Sont également apposés au dendrogramme, les ordres de rivières (en 3 classes). Il semblerait émerger un lien entre la structure des populations dénitrifiantes *nosZ* et les ordres de rivières : une structure A (encadré jaune), dans les sédiments aux petits ordres de rivière, une structure B (encadré vert) dans les eaux et sédiments aux ordres de rivières moyens et élevés. Les taux de dénitrification potentielle sont indiqués pour les échantillons de sédiments qui ont fait l'objet d'expérimentations en batchs (Garnier *et al.*, 2010) sans qu'aucun lien non plus n'ait été trouvé.

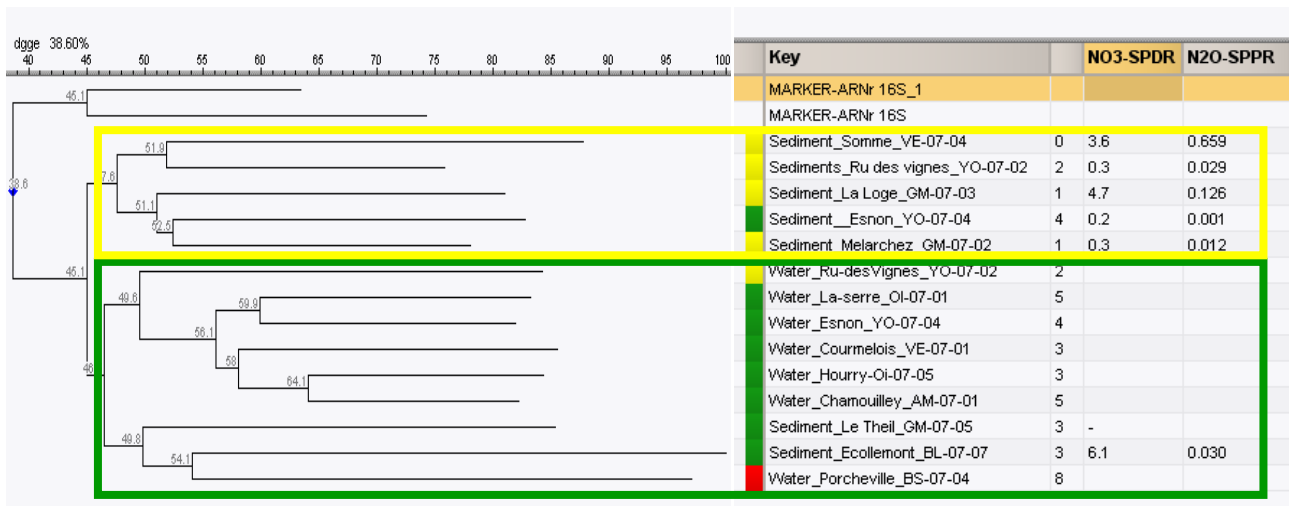


Figure 2 : Comparaison de structure des populations bactériennes catabolisant le N_2O des eaux et sédiments du Bassin de la Seine obtenue par DGGE du locus *nosZ*

A gauche le dendrogramme (Coefficient de similarité : indice de Jaccard, méthode de reconstruction : neighbour-joining). ; au milieu, les pistes de gels permettant de l'élaborer, à droite les informations sur les échantillons. Les carrés correspondent aux ordres de rivières : jaune, de 0 à 3, vert 4-5 et rouge supérieur à 5. Sont ajoutés les taux de dénitrification (NO_3^- SPDR : Semi Potential Denitrification Rate) et de production N_2O (N_2O SPPR : Semi Potential Production Rate) exprimés en $\mu g N g^{-1} h^{-1}$.

3 Conclusion

Cette étude de la structure des populations bactériennes, comme elle s'attache aux ADN et pas aux ARN permet de se faire une idée des potentialités des milieux (via leurs populations bactériennes) à consommer et/ou produire du N_2O mais ne donne en aucun cas une idée de l'activité réelle. Cette approche nécessite donc d'être couplée à des mesures d'activités dénitrifiantes ou de production N_2O comme nous l'avons fait.

Cette même approche sera prochainement appliquée à des sols du bassin de la Seine montrant des propriétés intrinsèques moins différentes que celles des échantillons étudiés ici.

Après avoir testé l'efficacité de nos approches dans les eaux, les sédiments et les sols, nous chercherons également à appréhender la diversité des bactéries dénitrifiantes et nitrifiantes, en ciblant des zones d'intérêt dans le bassin de la Seine.

Il pourrait également être pertinent d'élargir à d'autres processus du cycle de l'azote dans lesquels NO_3^- et N_2O interviennent également tels que la nitrification, la DNRA et l'anammox.

- Braker G, Fesefeldt A, Witzel KP (1998) Development of PCR Primer systems for amplification of nitrite reductase genes (Nirk and Nirs) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 64:3769-3775
- Cébron Aurélie. (2004). Nitrification, bactéries nitrifiantes et émissions de N₂O: La Seine en aval de Paris. Ph-D Univ. Paris 6 (UPMC), ED " Géosciences et Ressources Naturelles". 288 pp.
- Cebbron A, Berthe T, Garnier J (2003) Nitrification and Nitrifying Bacteria in the Lower Seine River and Estuary (France). *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7091-7100
- Cebbron A, Coci M, Garnier J, Laanbroek HJ (2004) Denaturing gradient gel electrophoretic analysis of ammonia-oxidizing bacterial community structure in the lower Seine River: Impact of Paris wastewater effluents. *Applied And Environmental Microbiology* 70:6726-6737
- Kloos K, Mergel A, Rosch C, Bothe H (2001) Denitrification within the genus *Azospirillum* and other associative bacteria. *Australian Journal Of Plant Physiology* 28:991-998
- Michotey V, Mejean V, Bonin P (2000) Comparison of methods for quantification of cytochrome cd(1)-denitrifying bacteria in environmental marine samples. *Applied and Environmental Microbiology* 66:1564-1571
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59:695-700
- Roose-Amsaleg CL, Garnier-Sillam E, Harry M (2001) Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment. *Applied Soil Ecology* 18:47-60
- Talleg G, Gaëlle. (2005). Émissions d'oxyde nitreux lors du traitement de l'azote en station d'Épuration. Ph-D Ecole Nationale des Ponts et Chaussées, ED "Ville et Environnement", 209pp.
- Talleg G, Garnier J, Billen G, Gousailles M (2006) Nitrous oxide emissions from secondary activated sludge in nitrifying conditions of urban wastewater treatment plants: Effect of oxygenation level. *Water Research* 40:2972-2980
- Thieu V, Billen G, Garnier J (2009) Nutrient transfer in three contrasting NW European watersheds: The Seine, Somme, and Scheldt Rivers. A comparative application of the Seneque/Riverstrahler model. *Water Research* 43:1740-1754
- Throbäck IN, Enwall K, Jarvis A, Hallin S (2004) Reassessing PCR primers targeting nirS, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *Fems Microbiology Ecology* 49:401-417