

N° d'ordre de la thèse :

THESE DE DOCTORAT D'AIX-MARSEILLE UNIVERSITE

Ecole Doctorale : Sciences de l'environnement

Présentée par

IMEN ZAGHMOURI

En vue de l'obtention du grade de Docteur d'Aix-Marseille Université

Spécialité : Océanographie

Impact des fluctuations de salinité sur le cycle de l'azote dans les sédiments de l'étang de Berre

Date de la soutenance : le 07 Mars 2013 devant la commission d'Examen

Composition du Jury

Mme J. GARNIER	Directeur de Recherche, CNRS Paris VI	Rapporteur
M. R. DE WIT	Directeur de Recherche, CNRS Montpellier II	Rapporteur
M. P. RAIMBAULT	Directeur de Recherche, CNRS, Aix-Marseille Université	Examineur
M. G. BERNARD	Docteur, GIPREB	Examineur
Mme. P. BONIN	Directeur de Recherche, CNRS, Aix-Marseille Université	Directrice de thèse
Mme. V. MICHOTÉY	Professeur, Aix-Marseille Université	Directrice de thèse

Remerciements

Après trois années passées au Mediterranean Institute of Oceanography (ancien COM), voici le temps de pouvoir enfin remercier toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail de thèse.

Financée par le Ministère Tunisien de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique et de la Technologie, je tiens d'abord, à remercier le gouvernement tunisien de m'avoir attribué cette bourse d'étude.

Ce travail a été réalisé au sein de l'Institut Pytheas (équipe MEB) du MOI. A ce titre, je tiens à remercier M. Richard Sempéré de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

J'exprime toute ma gratitude à Mme. Josette Garnier, à M. Rutger De Wit, à M. Patrick Raimbault et à M. Guillaume Bernard qui m'ont fait l'honneur d'être au jury de ma thèse et qui ont accordé de leur temps pour évaluer mon travail.

Cette thèse n'aurait pas vu le jour sans l'aide, le soutien, la patience et la disponibilité des mes directrices de thèse Patricia Bonin et Valérie Michotey. Je les remercie pour leur confiance, et j'espère avoir été à la hauteur, pour leurs conseils et pour l'autonomie qu'elles m'ont accordée.

Je souhaite également remercier Nicole Garcia, sans qui l'analyse des échantillons n'aurait pas pu être possible. Je la remercie vivement pour son aide et sa patience.

Merci à Nicolas Mayot qui m'a fournis les données des suivis temporels à l'étang de Berre depuis 1994.

Je tiens également à remercier Sophie Guasco et Axel Aigle pour toute la partie biologie moléculaire. Merci !

Merci à l'équipage de l'Antedon II qui m'a aidé à prélever les tonnes d'échantillons d'eau et de sédiment de l'étang de Berre.

Un grand merci à l'ensemble du personnel du MIO, particulièrement l'équipe du 2^{ème} étage. Merci à Sophie, Axel, Marjolaine, Ikram, Cécile, Philippe, Monique, Cédric, Danielle pour la bonne ambiance, pour leur amitié tellement précieuse à mes yeux, leur générosité et les bons souvenirs que je vais garder.

Enfin un merci particulier à ma famille et mes amis qui m'ont tellement soutenue et sans qui rien n'aurait été possible. Merci d'être là pour moi...

Table des matières

Introduction générale	19
Chapitre I : Synthèse bibliographique.....	27
1. Le cycle de l'azote	27
1.1 Assimilation des composés azotés :	30
1.1.1 Assimilation de l'ammonium :	30
1.1.2 Assimilation du nitrate :	30
1.2 Fixation de l'azote N₂ :	30
1.3 Processus conduisant à la production d'ammonium :	31
1.3.1 Minéralisation-ammonification de l'azote :	31
1.3.2 Réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium (RDNA) :	32
1.4 Processus conduisant à la production de nitrate : la nitrification :	32
1.5 Production d'azote N₂ :	35
1.5.1 Dénitrification :	35
1.5.2 Anammox :	41
2. Echanges de sels nutritifs à l'interface eau-sédiment.....	48
3. Production nouvelle et production régénérée	50
4. Présentation de l'étang de Berre	52
4.1 Caractéristiques géographiques et climatologiques :	52
4.2 Les apports en eau douce :	53
4.2.1 Les apports naturels :	53
4.2.2 Les apports de la centrale hydro-électrique de Saint Chamas :	54
4.3 Récapitulatif historique des événements ayant marqués l'écologie de l'étang de Berre :	55
4.4 Détérioration de l'état écologique de l'étang de Berre :	57
4.4.1 La contamination chimique :	57
4.4.2 Apports en eau douce :	58
4.4.3 L'eutrophisation :	59
4.5 Devenir des sels nutritifs :	61
5. Changements de salinité dans les systèmes lagunaires.....	64
6. Réponse des lagunes côtières face aux perturbations	68
6.1 Dynamiques de résilience et régimes shifts dans les écosystèmes :	70
6.2 Dynamiques de résilience et biodiversité :	73

6.3	Resistance et résilience des communautés microbiennes :	74
Chapitre II: Partie expérimentale		81
1.	Sites d'échantillonnage :	81
2.	Echantillonnage :	82
3.	Dosage des composés azotés:	83
3.1	Dosage des nitrates et nitrites :	83
3.2	Dosage de l'ammonium :	84
3.3	Quantification des isotopes de l'azote par spectrométrie de masse:	85
3.4	Teneur en matière organique :	86
4.	Quantification des activités microbiennes :	86
4.1	Mesure des flux de N ₂ : dénitrification et anammox:	86
4.1.1	Préparation des échantillons :	86
4.1.2	Réduction du nitrate, dénitrification et anammox :	87
4.2	Réduction Dissimilatrice du Nitrate en Ammonium (RDNA) et nitrification :	88
4.3	Ammonification (ammonium produit par minéralisation de l'azote) :	90
5.	Réalisation des microcosmes :	91
5.1	Description des microcosmes :	91
5.2	Simulations des fluctuations de la salinité dans les microcosmes :	92
6.	Approche moléculaire et diversité microbienne :	95
6.1	Techniques de biologie moléculaire :	95
6.1.1	Extraction des acides nucléiques :	95
6.1.1.1	Extraction d'ADN à partir des échantillons de sédiments :	95
6.1.1.2	Extraction d'ARN à partir des échantillons de sédiments :	95
6.1.2	Détection et quantification d'acides nucléiques par PCR :	96
6.1.3	PCR des gènes codant pour l'ARNr 16S <i>Archaea</i> et <i>Bacteria</i> :	99
6.1.4	Amplification des gènes amoA <i>Archaea</i> et <i>Bacteria</i> :	100
6.1.5	La PCR quantitative (q-PCR) :	101
6.1.6	Reverse Transcriptase (RT-PCR) :	104
6.1.7	Electrophorèse sur gel d'agarose :	104
6.2	Etude de diversité:	105
6.2.1	Empreinte génétique par DGGE:	105
6.2.2	Analyse de séquence :	107
6.3	Analyse de données :	108
Chapitre III: Trends in salinity and inorganic nitrogen compounds in the Berre Lagoon (1994–2011): Bacterial activities and nitrogen budgets		113

Avant propos.....	115
1. Abstract.....	117
2. Introduction	118
3. Material and Methods.....	121
3.1 Study area.....	121
3.2 Sample collection.....	122
3.3 Nutrient analysis.....	123
3.4 Microbial activities.....	124
3.4.1 Experimental design.....	124
3.4.2 Denitrification and anammox rates.....	125
3.4.3 DRNA rates	125
3.4.4 Nitrate reduction rates	126
3.4.5 Nitrification rates.....	126
3.4.6 Ammonium produced by mineralization.....	127
3.5 Statistical analysis.....	127
4. Results	128
4.1 Physico-chemical characteristics of the overlying water and sediments from 1994 to 2010.....	128
4.2 Bacterial activities.....	132
5. Discussion.....	136
6. Conclusion	143
7. Acknowledgements	145
8. References:.....	146
Chapitre IV: Short-term responses of nitrogen fluxes in the sediments of a coastal lagoon exposed to long-term in situ salinity fluctuations: a microcosm study	157
Avant propos.....	159
1. Abstract.....	161
Keywords: salinity fluctuations, microcosm, denitrification, nitrification, nitrate reduction, resilience, change.....	161
2. Introduction	162
3. Materials and methods	165
3.1 Sampling sites	165
3.1.1 Sample collection	166

3.1.2	Description of microcosms	166
3.1.3	Microcosm experiment.....	168
3.2	Microbial activities.....	170
3.2.1	Denitrification and anammox rates.....	171
3.2.2	DNRA and Nw rates.....	172
	Nitrate and nitrite concentrations in the overlying water column were analysed with a Technicon-Auto-Analyser according to Treguer and Le Corre (1975). Ammonium concentrations were determined using the fluorometric method (Kérouel and Aminot 1997).	172
3.2.3	Nitrate reduction rates	173
3.3	Statistical analysis.....	173
4.	Results	174
5.	Discussion.....	181
6.	Conclusions.....	186
7.	Acknowledgements	187
8.	References.....	188
	Chapitre V: Short term response toward salinity changes of microbial and nitrifying communities of sediments exposed to different long-term in situ stresses: a microcosm approach.....	197
	Avant propos.....	199
1.	Abstract.....	201
2.	Introduction	202
3.	Materials and methods	205
3.1	Sediment sampling and Microcosms set up	205
3.2	Total nitrification rates	209
3.3	Molecular studies	210
3.3.1	Molecular Fingerprinting Analysis of Microbial and nitrifying communities	210
3.3.2	Communities' abundance	212
3.4	Statistical analysis.....	213
4.	Results.....	215
4.1	Total nitrification activity	215
4.2	AOA and AOB abundance (DNA and RNA).....	216
4.3	Diversity of total and ammonia oxidizing communities.....	221
5.	Discussion.....	225

6. Conclusion	231
7. Acknowledgements	232
8. References	233
Chapitre VI: Conclusions et Perspectives	241
1. Conclusions générales.....	241
2. Perspectives	248
Références bibliographiques.....	253
Annexes	279

Liste des figures

Chapitre I

Fig. I. 1 Schéma simplifié du cycle de l'azote dans les sédiments marins côtiers (Bonin, 2000 modifié)	29
Fig. I. 2 Chaîne de transport d'électrons des bactéries dénitrifiantes (Minjeaud et al. 2008).....	39
Fig. I. 3 Photo en microscopie à transmission d'une cellule de <i>Candidatus Kuenenia stuttgartiensis</i> montrant certains compartiments cellulaires, notamment l'anammoxosome (Kuenen 2008). ...	44
Fig. I. 4 Voie biochimique du processus d'anammox (Jetten et al. 2001).....	46
Fig. I. 5 Localisation de l'étang de Berre	53
Fig. I. 6 Les bassins versants de l'étang de Berre.....	55
Fig. I. 7 Description simplifiée d'une lagune eutrophisée (Souchu et al. 1998a).....	59
Fig. I. 8 Schéma conceptuel du cycle de l'azote dans le sédiment et la colonne d'eau.....	63
Fig. I. 9 Interactions de la lagune avec la mer, le continent et l'atmosphère (Castel et al. 1996)..	66
Fig. I. 10 Schéma de la manière dont la perturbation peut induire le changement la composition microbienne et affecter les processus écosystémiques.....	76

Chapitre II

Fig. II. 1 Localisation des stations d'échantillonnage SA1 (43°29.735N, 5°2.953E, ~6m de profondeur) et SA3 (43°25.300N, 5°6.219E, ~9m de profondeur).....	81
Fig. II. 2 Schéma d'un montage d'un microcosme, chaque microcosme étant connecté à une pompe péristaltique et un réservoir d'eau de mer synthétique à la salinité requise.....	92
Fig. II. 3 Diagrammes des scénarios de fluctuations de salinité dans les sédiments de la station SA1 (a) et de la station SA3 (b).....	94
Fig. II. 4 Résultats d'une PCR quantitative et exemple d'une droite d'étalonnage.....	102

Chapitre III

Fig. III. 1 Location of the sampling stations SA1 (43°29.735 N, 5°2.953E, ~6 m deep) and SA3 (43°25.300N, 5°6.219 E, ~9 m deep) in the Berre lagoon (SE France).....	122
Fig. III. 2 Box plot comparing annual evolution of salinity values (a, b), nitrate (c, d) and ammonium (e, f) concentrations, in SA1 and SA3 respectively. These physical and chemical parameters were measured in the bottom layer of both stations. Arrows mark the year of	

effective restriction in freshwater and nutrient loadings. Box plot: the center vertical line marks the median, the edges of the box mark first and third quartiles and the vertical lines indicate the range of values that fall within 1.5 (midrange) of the hinges, the cross marks the mean value (n=192 for each parameter of every station).	130
Fig. III. 3 Mean oxygen saturation (%) profiles at SA1 (a, to 4 m depth, n=11) and SA3 (b, to 9 m depth, n=26) from 1994 to 2011.	131
Fig. III. 4 Nitrate reduction pathway and SE comprising coupled nitrification-denitrification (Dn, in white), denitrification based on NO_3^- in the bottom water (Dw, in grey), dissimilatory nitrate reduction to ammonia (DNRA, in black) and anammox (not detected), n=12.	133
Fig. III. 5 Total denitrification rates and SE, comprising coupled nitrification-denitrification (Dn, in white) and denitrification based on NO_3^- in the bottom water (Dw, in grey), n=12.	134
Fig. III. 6 Total nitrification rates and SE, comprising nitrification coupled to denitrification (Dn) and nitrification producing NO_3^- to the water column (Nw), n=12.	135
Fig. III. 7 Mineralization rates and SE, comprising the apparent ammonium production and the total nitrification, n=12.	135
Fig. III. 8 (a) Ammonium N-NH_4^+ budget and SE comprising pelagic uptake, water column regeneration and sediment net mineralization, (b) nitrate N-NO_3^- budget and SE comprising pelagic uptake, net nitrification pelagic and nitrification producing NO_3^- to the water column (Nw), (*pelagic uptake and water column regeneration data were collected from Gouze et al. (2008) in the same stations.	140

Chapitre IV

Fig. IV. 1 Location of Berre lagoon and sampling stations.	165
Fig. IV.2 Schematic of one microcosm chamber setup. Each microcosm was connected to a peristaltic pump and to a reservoir.	167
Fig. IV. 3 Summary diagrams of salinity fluctuation scenarios in the SA1 sediment (collected in March 2011) (a) and SA3 sediment (collected in December 2010) (b).	169
Fig. IV. 4 Variations in Nitrate Reduction (NaR) ($\mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$) (a), denitrification ($\mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$) (b) and net nitrification (Nw) ($\mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$) (c) rates during the 3 incubation phases in SA1. Box-plots represent multiple sampling in each microcosm. During Phase 1, the five independent replicates were at <i>in situ</i> salinity during 3 days, n=12 samples were used to build a box-plot per microcosm. Every day and for each microcosm, 4 samples were collected at 10h interval.	176
Fig. IV. 5 Variations in Nitrate Reduction (NaR) ($\mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$) (a), denitrification ($\mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$) (b) and net nitrification (Nw) ($\mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$) (c) during the 3 incubation phases in SA3. Box-plots represent multiple sampling in each microcosm. During Phase 1, the five independent replicates were at <i>in situ</i> salinity during 3 days, n=12 samples were used to build the box-plot. Every day and for each microcosm, 4 samples were collected at 10h interval.	178

Chapitre V

Fig. V. 1 Location of the sampling stations SA1 (43°29.735N, 5°2.953E, 6 m deep) and SA3 (43°25.300N, 5°6.219E, 9 m deep) in the Berre lagoon (SE France).....	206
Fig. V. 2 Summary diagrams of salinity fluctuation scenarios in the SA1 sediment (collected in March 2011) (a) and SA3 sediment (collected in December 2010) (b).	208
Fig. V. 3 Total nitrification rates as the sum of net nitrification (NO ₃ ⁻ released to the overlying water) and Dn (denitrification of NO ₃ ⁻ produced through nitrification) and SE measured in cores after sub-sampling of SA1 and SA3 microcosms.	216
Fig. V. 4 Mean 16S rDNA gene copy numbers per gram of wet sediment in the top 0-2cm from SA1 and SA3 microcosms. Data represent triplicate samples.....	217
Fig. V. 5 Mean amoA gene copy numbers per gram of wet sediment in the top 0-2cm from SA1 and SA3 microcosms. Data represent triplicate samples.	219
Fig. V. 6 Total amoA RNA abundance normalized to control (M1) versus total nitrification rates normalized to control (M1).....	221
Fig. V. 7 Cluster analysis of microbial communities based on Pearson correlation derived from bacterial 16S rRNA gene (a), archaeal 16S rRNA gene (b), bacterial amoA (c) and archaeal amoA (d) genes in SA1 and SA3 microcosms.	222
Fig. V. 8 DGGE from a PCR amplification of archaeal <i>amoA</i> gene. One replicate per salinity treatment is shown. Bands are numbered from A1 to A5. A3 band is not shown in the DGGE profile.....	223
Fig. V. 9 Phylogenetic relationships achieved by a Neighbor-Joining tree based on archaeal <i>amoA</i> sequences (495bp). Values at the node indicate bootstrap percentage over 500 replicate trees.	224
Fig. V. 10 Principle Components analysis (PCA) including SA1 and SA3 microcosms, total nitrification rates, some environmental parameters (salinity, [NO ₃ ⁻], [NH ₄ ⁺]) and the percentage of AOB <i>amoA</i> RNA/total <i>amoA</i> RNA	226
Fig. V. 11 Biplots of Canonical Correspondence Analysis (CCA) of AOA and AOB <i>amoA</i> gene from DGGE data obtained from SA1 and SA3 submitted to different salinity treatments.	228

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau I.1 Exemples de genres bactériens dénitrifiants et leurs principaux métabolismes	38
Tableau I.2 Importance relative du processus d'anammox dans les flux de N ₂ (par rapport à la dénitrification)	43
Tableau I.3 Effets directs du changement climatique sur le fonctionnement des lagunes côtières (processus et propriétés physiques) (Bernasconi et al. 2005).	69
Tableau I.4 Etats alternatifs dans une diversité d'écosystèmes (1,4) avec les causes (2) et les déclencheurs (3) impliqués dans la perte de résilience et le changement d'état (Folke et al. 2004)	71

Chapitre II

Tableau II.1 Calendrier des prélèvements effectués dans les stations d'échantillonnage SA1 et SA3.	82
Tableau II.2 Tableau récapitulatif des traitements des échantillons pour la quantification de la RDNA et de la nitrification (D'après Gouze et al. 2008).....	89
Tableau II. 3 Récapitulatifs des amorces et des programmes PCR utilisés lors de cette étude.....	97

Chapitre III

Table III.1 : ANOVA analysis comparing the stations (SA1 and SA3), time (season) and sediment layers for environmental parameter and bacterial N-processes. When a significant effect is found with 'Time', the month with maximal activity is indicated. Ns: not significant; *** p<0.001; ** p<0.01; * p<0.05.....	129
Table III.2 Temperature, salinity in the bottom water and DIN concentrations in the bottom water and sediments, from April 2010 to April 2011, at SA1 and SA3.....	132

Chapitre V

Table. V. 1 Quantification of bacterial and archaeal SSU rRNA and amoA genes or transcripts .	218
---	-----

Liste des abréviations

ADNc	ADN complémentaire
ADP	Adénosine diphosphate
amo	Ammonia monoxygénase
ANOVA	Analysis of variance
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BET	Bromure d'éthidium
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DNRA (ou RDNA)	Dissimilatory nitrate reduction to ammonium
dNTP	Désoxyribonucléotide
EMS (ou SSW)	Eau de mer synthétique
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse
IPM	Isotope Pairing Method
NAD/NADH	Couple redox Nicotinamide adénine di nucléotide
N	Azote
NaR	Nitrate réduction
NH ₄ ⁺	Ammonium
NO ₃ ⁻	Nitrate
NO ₂ ⁻	Nitrite
N ₂	Diazote
NO	Oxyde nitrique
N ₂ O	Oxyde nitreux
NH ₃	Ammoniaque
Norg	Azote organique
P	Phosphore
pH	Potentiel hydrogène
P _i	Phosphate inorganique
Q-PCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction

16S rDNA	ADN codant pour l'ARN ribosomal 16S
LB	Milieu de culture Luria Broth
TBE	Tris-Borate-EDTA
TAE	Tris-Acétate-EDTA
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
GIPREB	Syndicat mixte de Gestion Intégrée, Prospective et Restauration de l'Etang de Berre
nif	Nitrogen fixation gene
nrf	Nitrite reduction by formate
hao, hyc ou cyc	Hydroxylamine oxydoréductase
NOR	Nitrite oxydoréductase
Nir	Nitrite réductase
Nar (ou Nap)	Nitrate réductase
e ⁻	électron
NOS	Oxyde nitreux réductase
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
CTD	Conductivity, Temperature and Depth Sonde
PVC	Polychlorure de vinyle
HCl	Acide chloridrique
KCl	Chlorure de potassium
Ar	Argon
HgCl ₂	Chlorure mercurique
MgO	Oxyde de magnésium
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
IRT	Inhibitory Removal Technology
DO	Densité optique

Introduction générale

Introduction générale

De par leur position d'interface entre le milieu continental et maritime, les écosystèmes littoraux tels que les lagunes, les estuaires et les marais salants sont des environnements hautement productifs (Castel et al. 1996) et jouent un rôle pilier dans la dynamique biogéochimique des océans (Gattuso et al. 1998). Au sein de la frange côtière, la plupart des lagunes sont sujettes à des modifications naturelles permanentes et sont particulièrement actives d'un point de vue biogéochimique. En effet, l'abondance des sels nutritifs et la faible profondeur entraînent de forts taux de production primaire. Cette production primaire permet un enrichissement massif des sédiments intertidaux en matière organique.

Les sédiments supportent une très forte activité bactérienne et constituent le siège de la reminéralisation de la matière organique en fonction du gradient d'oxygène. Ils sont également connus pour être des sites importants d'élimination de l'azote inorganique de l'environnement, via le processus benthique de la réduction du nitrate sous forme de gaz (Dong et al. 2009). Les sédiments côtiers sont, de ce fait, des sites privilégiés pour l'étude des processus aux interfaces aérobie/anaérobie.

La compréhension des dynamiques de l'azote dans les systèmes côtiers est essentielle pour prédire les effets des apports en sels nutritifs sur les dynamiques de l'écosystème (Gardner et al. 2006). La production primaire dans ces écosystèmes côtiers dépend souvent du cycle de l'azote dans la colonne d'eau et dans les sédiments qui fournissent une matrice pour les processus affectant les sources, les transformations et les puits d'azote (Gardner et al. 2006). La compétition, la perturbation et les réponses de ces

processus face à un stress environnemental sont des paramètres importants qui déterminent la distribution et l'abondance des organismes au sein d'une communauté (Fong et al. 1996).

L'azote, élément limitant de la production primaire dans les écosystèmes côtiers, peut être introduit dans les eaux côtières par les apports des tributaires, des dépôts atmosphériques ou des eaux souterraines sous forme de nitrate/nitrite (NO_3^- , NO_2^-), d'ammonium (NH_4^+) et de matière organique ou par la fixation de N_2 . L'ammonium peut alors s'accumuler dans le sédiment, être éliminé par diffusion ou advection au niveau de l'interface eau/sédiment, assimilé par les plantes ou les bactéries. L'ammonium peut également être oxydé sous forme de NO_3^- ou NO_2^- (nitrification) ou réduit sous forme de N_2 ou N_2O par le processus de dénitrification (Cornwell et al. 1999, Gardner et al. 2006).

L'importance relative de ces processus dépend fortement de certaines conditions environnementales telles que la concentration en oxygène, la température, la salinité, les apports en carbone organique et la présence de macrophytes, de microphytobenthos ou de macrofaune (Cornwell et al. 1999). Les changements et les fluctuations de ces conditions peuvent perturber le fonctionnement de l'écosystème, des processus et des communautés.

Ce travail de thèse s'inscrit dans un large contexte ayant pour objectif la réhabilitation de l'étang de Berre et vise à comprendre le fonctionnement biogéochimique dans les sédiments de l'étang, particulièrement le cycle de l'azote et la contribution de ses processus dans l'état d'eutrophisation de cet écosystème. Ce mémoire s'articule en cinq chapitres qui se répartissent comme suit :

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Ce chapitre se focalise sur divers rappels bibliographiques concernant :

- Une présentation de l'étang de Berre : ses caractéristiques géographiques et l'impact des activités humaines sur son état écologique.
- Une synthèse du cycle de l'azote incluant les différents processus, leur régulation et les microorganismes associés.
- Un bref rappel sur les changements de salinité dans les systèmes lagunaires et leurs effets sur les processus du cycle de l'azote.
- La réponse des lagunes côtières face aux perturbations qui met en évidence les dynamiques de résistance, résilience et régimes shifts dans ces écosystèmes et la réponse des communautés face à ces perturbations.

CHAPITRE II : PARTIE EXPERIMENTALE

Ce chapitre présente l'ensemble des méthodes et des protocoles expérimentaux utilisés au cours des différents chapitres de la thèse.

CHAPITRE III : TENDANCES DE LA SALINITE ET DES COMPOSES D'AZOTE INORGANIQUE DANS L'ETANG DE BERRE ENTRE 1994 ET 2011 : ACTIVITES BACTERIENNES ET BUDGETS D'AZOTE

Cette étude se concentre sur l'évolution des teneurs en salinité et en nitrate depuis 1994 dans l'étang de Berre, ainsi que la qualification et la quantification des processus de l'azote annuels et saisonniers dans ses sédiments. Des budgets d'ammonium et de nitrate ont été établis en nous basant sur nos données sur le sédiment et les données fournies par Gouze et al. (Gouze et al. 2008b) sur la colonne d'eau dans le but d'expliquer l'importante production primaire par les processus de régénération.

CHAPITRE IV : L'EFFET A LONG TERME DES FLUCTUATIONS A COURT TERME DES SALINITES IN SITU SUR LES REPONSES DES FLUX D'AZOTE : UNE APPROCHE EN MICROCOSMES

Dans ce chapitre, une étude en microcosmes a été réalisée afin d'évaluer la sensibilité des processus du cycle de l'azote face à des fluctuations à court terme de la salinité. Les sédiments choisis lors de cette étude proviennent de deux stations de l'étang de Berre, caractérisées par des données historiques particulières de la salinité.

CHAPITRE V : REPONSE DES COMMUNAUTES PROCARYOTIQUES RESPONSABLES DE LA NITRIFICATION FACE AUX FLUCTUATIONS DE LA SALINITE

Afin d'approfondir les résultats obtenus dans le Chapitre IV et de confirmer le rôle majeur des microorganismes sur les activités du cycle de l'azote, nous avons essayé, dans ce chapitre, de mettre en évidence l'impact des variations de la salinité sur l'abondance et la composition des communautés bactériennes et archéennes totales et nitrifiantes présentes dans les microcosmes au début et à la fin de l'expérimentation.

CHAPITRE VI : DISCUSSION GENERALE

Ce chapitre propose une discussion générale et les principales perspectives associées à ce travail.

ANNEXES:

Dans cette partie, un article (Quantification des activités du cycle de l'azote dans les sédiments de la station nord (SA1) de l'étang Berre : impact de ces processus sur l'état d'eutrophisation de l'écosystème) faisant partie des Actes des Rencontres Lagun'R

organisé par le GIPREB et un article (Trends in salinity and inorganic nitrogen compounds in the Berre lagoon (1994-2011) bacterial activities and nitrogen budgets) sous presse dans Marine Pollution Bulletin sont représentés.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Le cycle de l'azote

En tant qu'élément limitant pour la productivité biologique, l'azote occupe un rôle central dans la biogéochimie des océans, exerçant une influence significative sur les cycles de nombreux autres éléments, en particulier le carbone et le phosphore (Gruber 2008). C'est aussi un constituant important pour les organismes vivants pour lesquels il représente en moyenne 6.25% de leur masse sèche (Galloway et al. 2003). Dans le milieu naturel, les composés azotés sont présents sous des formes organiques ou inorganiques sous cinq états d'oxydation différents (Galloway et al. 2003); ils peuvent se trouver dans le milieu marin sous forme de nitrate NO_3^- , avec un état d'oxydation de +V, de nitrite, NO_2^- (+III), d'oxyde d'azote, N_2O (+I), d'azote moléculaire, N_2 (0) et d'ammonium, NH_4^+ (-III).

Les sédiments marins côtiers sont soumis à un ensemble complexe de mécanismes de régulation impliquant des facteurs à la fois physico-chimiques et biologiques (Herbert 1999). Dans ces écosystèmes, les communautés microbiennes jouent un rôle clé dans l'oxydation et donc, la minéralisation des composés organiques complexes et dans la régénération des nutriments essentiels pour le maintien de la production primaire à l'interface eau-sédiment (Herbert 1999, Bonin 2000). En effet, en milieu côtier, les apports de matière organique sont particulièrement élevés et contiennent une importante fraction de composés azotés essentiellement sous forme de protéines, d'acides nucléiques, de glycoprotéines et de produits d'excrétion (urée et acide urique). Les principales sources contrôlant les concentrations des composés azotés inorganiques,

principalement le nitrate et l'ammonium, dans la colonne d'eau de faible profondeur (0.5-50 m de profondeur) sont les entrées d'eau découlant des rejets fluviaux et des dépôts atmosphériques (Herbert 1999). De plus, ces sources d'azote sont sous l'influence des activités anthropiques, et sont donc soumises à la décharge massive de composés organiques (Galloway et al. 2003). Par conséquent, l'azote organique inclut une très grande variété de composés qui diffèrent en taille, en complexité ou en état de dégradation (Zehr & Ward 2002). La régénération de ce pool de matière va donc être fonction de la qualité de matériel déposé, de sa quantité et de sa distribution spatiale (Herbert 1999). Les taux de décomposition de la matière organique sont en partie fonction des taux de déposition qui conditionnent la labilité de la matière et donc son éventuelle utilisation par la communauté bactérienne (Herbert 1999, Bonin 2000). Les échanges de nutriments à l'interface eau/sédiment sont donc largement déterminés par le taux de sédimentation et de décomposition de la matière organique (Herbert 1999). Le cycle de l'azote est constitué d'une succession de réactions d'oxydo-réduction aérobie et anaérobie permettant la transformation des composés azotés. Ce cycle complexe est représenté dans la Fig. I. 1.

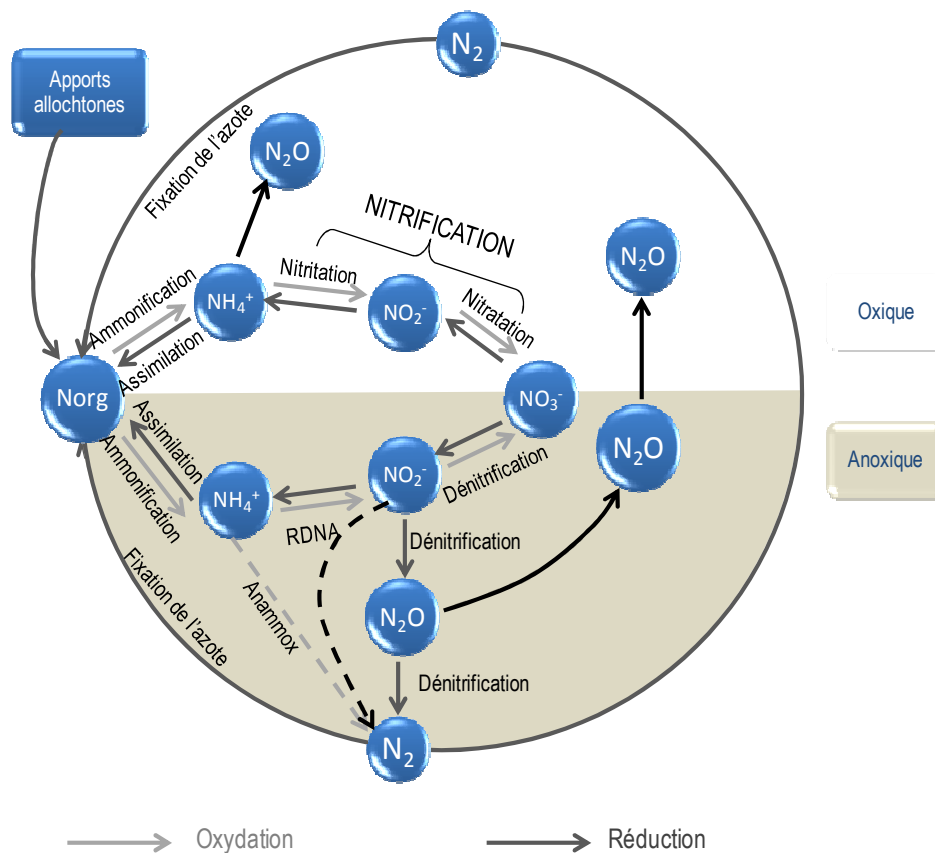


Fig. 1. 1Schéma simplifié du cycle de l'azote dans les sédiments marins côtiers (Bonin, 2000 modifié)

Le cycle de l'azote revêt un intérêt particulier puisqu'il va réguler la quantité d'azote disponible pour la chaîne trophique. L'azote est assimilé sous forme d'ammonium ou de nitrate ; l'ammonium étant issu de la minéralisation de la matière organique ou de la réduction du nitrate. Le diazote est relativement inerte et ne peut être directement assimilé par certains microorganismes que lors du processus de fixation de l'azote qui assure la transformation de l'azote inorganique en substrats biologiquement assimilables : l'ammonium (NH_4^+) et son acide conjugué, l'ammoniaque (NH_3). Il s'agit du principal mécanisme permettant l'introduction de l'azote dans la biosphère. NH_4^+ et NH_3 peuvent également être transformés en nitrate (NO_3^-) et nitrite (NO_2^-) lors de la

nitrification. Lors de la dénitrification, le nitrate est transformé en composés gazeux oxyde nitrique (NO), oxyde nitreux (N₂O) et enfin diazote (N₂) qui retournent vers l'atmosphère (Herbert 1999).

1.1 Assimilation des composés azotés :

L'ammonium est la forme préférentiellement assimilée par les microorganismes, alors que le nitrate est la forme « préférentiellement » assimilée principalement par la macroflore.

1.1.1 Assimilation de l'ammonium :

Quelque soit l'origine du NH₄⁺, celui-ci peut être assimilé par les microorganismes procaryotes et eucaryotes grâce à leur système enzymatique (GC-GOGAT) qui réduit l'azote oxydé en ammonium et ensuite en acides aminés (Zehr & Kudela 2011).

1.1.2 Assimilation du nitrate :

La réduction assimilatrice du nitrate est une réaction consommatrice d'énergie qui aboutit à la formation d'ammonium nécessaire à la biosynthèse cellulaire. Cette réaction est une voie généralement « préférentielle » pour la macroflore, mais a lieu seulement en absence d'ammonium chez les microorganismes. La nitrate réductase responsable de ce processus est inhibée par le chlorate et par la présence d'ammonium.

1.2 Fixation de l'azote N₂ :

Le diazote N₂ constitue 79% de l'atmosphère terrestre, mais ce réservoir majeur d'azote est peu réactif dans les conditions physiologiques (Paerl & Zehr 2000). Seuls les procaryotes diazotrophes ont la capacité de fixer ce diazote atmosphérique en

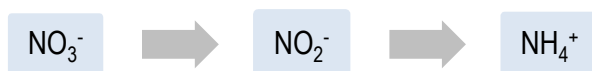
aérobiose, en microaérophilie, en anaérobie stricte ou facultative. Cette réduction du N_2 en NH_4^+ est confinée à certains groupes de microorganismes autotrophes ou hétérotrophes possédant un complexe dinitrogénase/dinitrogénase reductase (Herbert 1999, Bonin 2000, Paerl & Zehr 2000). Tous les groupes majeurs de Cyanobactéries mais aussi d'autres groupes comme les Chromatiaceae, les Chlorobiaceae, les Rhodospirallaceae et diverses bactéries autotrophes sont susceptibles de fixer le N_2 . Cette réaction est énergétiquement coûteuse, nécessitant environ 16 ATP par molécule de N_2 fixée mais aussi des métaux tels que le fer et le molybdène (Herbert 1999). Les inhibiteurs de la fixation d'azote sont principalement l'oxygène et l'oxyde de carbone (Bonin 2000, Newton 2007). Les gènes codant pour ce complexe enzymatique se trouvent sur l'opéron nif (*nifH*, *nifK*, *nifD*).

1.3 Processus conduisant à la production d'ammonium :

1.3.1 Minéralisation-ammonification de l'azote :

Dans les zones côtières, les sédiments sont des lieux privilégiés de transformation et de régénération des nutriments du fait de l'accumulation de la matière organique. La production d'ammonium à partir de la matière organique (ammonification) est régulée par la qualité et la quantité de la matière organique. En fonction du degré de complexité de la matière organique, l'ammonification peut être une simple réaction de désamination ou bien une suite de réactions métaboliques plus complexes. Une large gamme de microorganismes aérobies et anaérobies (*Pseudomonas*, *Vibrio*, *Proteus*, *Bacillus* et *Clostridium*) participent à cette réaction de régénération (Herbert 1999).

1.3.2 Réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium (RDNA) :

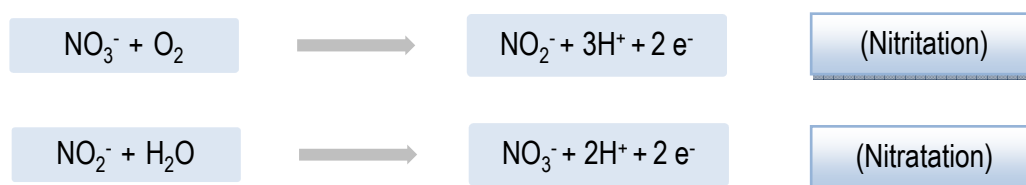


Bien que la dénitrification soit souvent considérée comme le seul processus de réduction dissimilatrice du nitrate (utilisation du nitrate comme accepteur d'électrons), la réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium (RDNA) peut être un processus dominant dans certains écosystèmes. La RDNA, qui correspond à une réduction anaérobie du nitrate en ammonium, ne conduit pas à une perte d'azote pour l'écosystème mais à la production d'ammonium, forme disponible pour la chaîne trophique (Bonin et al. 1998, Herbert 1999). L'excès d'ammonium n'inhibe pas la RDNA, alors qu'elle est inhibée en présence d'oxygène. Les microorganismes impliqués dans la RDNA sont autotrophes, hétérotrophes, fermentatifs, anaérobies strictes ou facultatifs. Les bactéries de la RDNA les plus couramment décrites sont des fermentatives appartenant aux genres *Aeromonas*, *Vibrio*, *Clostridium* et *Desulfovibrio* (Bonin 2000, Canfield 2005). La réduction du nitrite NO_2^- en ammonium NH_4^+ est réalisée en une seule étape par l'intermédiaire d'une enzyme : la *NrfA* (Simon 2002). Suivant les sites étudiés, la RDNA peut être la principale voie de réduction du nitrate en anaérobioses (Bonin et al. 1998), alors que dans d'autres sites, elle peut être un processus insignifiant (Binnerup et al. 1992).

1.4 Processus conduisant à la production de nitrate : la nitrification :

Dans les sédiments marins côtiers, l'oxydation de l'ammonium joue un rôle charnière dans le cycle de l'azote, en générant une source de nitrate non négligeable pour les processus de réduction du nitrate tels que la dénitrification et ammonification du nitrate (Bonin 2000).

Le processus de nitrification se déroule en deux étapes permettant l'oxydation de l'ammonium en nitrite (la nitritation) et l'oxydation du nitrite en nitrate (la nitratation) :



Les microorganismes nitrifiants sont pour la plupart chimiolithoautotrophes. Ils utilisent l'énergie dérivée de la nitrification pour fixer le CO_2 et pour synthétiser leur biomasse. Chaque étape de la réaction de nitrification est réalisée par une communauté bactérienne différente. La première étape d'oxydation de l'ammonium est réalisée par des bactéries ammonium oxydantes (AOB) ou bactéries nitrosantes ou nitritantes ainsi que des archées nitrosantes (AOA). La seconde réaction est réalisée par des bactéries nitrite oxydantes (NOB) ou nitratantes. Les bactéries nitrosantes sont généralement des β - et des δ -protéobactéries réparties dans 5 genres basés sur l'étude du gène *amoA* codant pour l'ammonium mono-oxygénase : *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* et *Nitrosovibrio* (Koops et al. 1991). Deux enzymes interviennent dans l'oxydation de l'ammonium en nitrite, l'ammoniac monooxygénase (codée par trois gènes *amoA*, *amoB* et *amoC* regroupés sur le même opéron), et l'hydroxylamine oxydoréductase (codée par les gènes *hao* et *hcy* ou *cyc*). Plus récemment des Archaea nitrifiantes (*Thaumarchaeota*) ont été identifiées.

Les organismes nitratants ou oxydant le nitrite (NOB) sont également des bactéries chimiolithoautotrophes, utilisant l'oxydation du nitrite en nitrate afin de produire de l'énergie, l'oxygène étant l'accepteur final d'électrons. Ces bactéries sont réparties en 4

genres : *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* (Koops et al. 1991). L'oxydation du nitrite en nitrate est réalisée par une nitrite oxydoréductase (*NOR*).

En plus de la nitrification aérobie autotrophe, Focht et Verstraete décrivent une voie de nitrification hétérotrophe réalisée par des microorganismes (champignons et bactéries) (Focht & Verstraete 1977). Bien que les substrats, les intermédiaires et les produits des nitrifications (autotrophe et hétérotrophe) soient les mêmes, ces deux processus diffèrent par leurs enzymes, notamment l'hydroxylamine oxydase (Wrage et al. 2001). Cette voie alternative hétérotrophe requiert une attention particulière liée à la versatilité métabolique des bactéries impliquées. En effet, la plupart des bactéries nitrifiantes hétérotrophes sont capables de dénitrification (*Arthrobacter globiformis*, *Aerobacter aerogenes*, *Mycobacterium phlei*, *Streptomyces griseus*, *Thiosphora* et *Pseudomonas spp.*) et donc susceptibles de modifier les flux d'azote. Jetten et al. ont montré qu'en présence de conditions d'oxygénation limitante et pour des rapports C/N élevés (10), la nitrification hétérotrophe devient le processus dominant et atteint jusqu'à 60% de la nitrification totale (Jetten et al. 1998). Cependant, dans les écosystèmes naturels, la nitrification autotrophe est en général, au moins 10 fois plus importante que la nitrification hétérotrophe (Castignetti & Hollocher 1984). Schimel et al. ont montré une corrélation négative entre les taux de nitrification hétérotrophe et les rendements au sein d'un chemostat et une corrélation positive avec l'augmentation des taux de croissance des microorganismes cultivés (Schimel et al. 1984). Par contre, dans un écosystème naturel, la nitrification hétérotrophe semble être indépendante du rendement cellulaire et donc des taux de croissance.

De nombreux facteurs environnementaux influent sur les réactions impliquées dans la nitrification. La présence d'oxygène est indispensable au développement de ces

microorganismes qui réalisent une respiration aérobie. L'oxydation de NO_2^- est diminuée en présence de lumière. Le pH et la température sont aussi des facteurs importants puisqu'ils agissent sur l'affinité de l'enzyme pour son substrat. La salinité semble avoir un effet très marqué sur la structure des communautés nitrifiantes. La présence de racines de macrophytes peut stimuler l'activité nitrifiante à cause de la production d'oxygène dans la rhizosphère. De même, l'activité de bioturbation par le macrobenthos altère les gradients de NH_4^+ et d' O_2 et stimule donc la nitrification (Bonin 2000, Sorokin et al. 2001). La présence de composés oxydés dans les sédiments (tels que les oxydes de manganèse), peut de façon abiotique, induire une oxydation de l'ammonium en nitrate et par conséquent une nitrification anaérobie (Hulth et al. 1999, Thamdrup & Dalsgaard 2000).

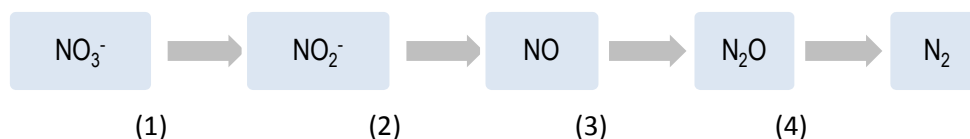
1.5 Production d'azote N_2 :

Les pertes d'azote de l'écosystème marin ont deux origines : la sédimentation et les processus bactériens, dont le produit final est l'azote moléculaire N_2 (Capone 2000). Parmi ces processus, on trouve la dénitrification et l'anammox (ANAerobic AMMonium Oxydation).

1.5.1 Dénitrification :

En absence d'oxygène, la dénitrification est un processus respiratoire microbien, alternatif à la respiration de l'oxygène, le nitrate servant d'accepteur terminal d'électrons à la place de l'oxygène au cours de la minéralisation anaérobie de la matière organique. La dénitrification, transformation du nitrate en diazote, est une succession de réductions au cours desquelles le nitrate initial (NO_3^-), est successivement réduit en nitrite (NO_2^-), oxyde nitrique (NO), oxyde nitreux (N_2O) pour aboutir à l'azote

moléculaire (N_2) (Canfield 2005). Chaque étape de la dénitrification est catalysée par un système enzymatique distinct :



Avec : (1) nitrate réductase, (2) nitrite réductase, (3) oxyde nitrique réductase, (4) oxyde nitreux réductase. Chaque réaction d'oxydo-réduction est indépendante et chaque souche dénitrifiante est susceptible de réaliser une ou plusieurs étapes de la dénitrification. La dénitrification complète est donc réalisée chez les microorganismes capables de catalyser les 4 réactions de la dénitrification.

Parmi les différents processus du cycle de l'azote, la dénitrification a longtemps été considérée comme le seul à l'origine de la perte d'azote dans l'écosystème sous forme de composés azotés gazeux, lui conférant ainsi un rôle majeur dans le cycle d'azote (Seitzinger 1988).

En milieu naturel, les taux de dénitrification sont variables en fonction des écosystèmes, des apports en nitrate mais aussi en fonction du temps. En zone côtière, les estuaires et les sédiments intertidaux sont des milieux soumis à des apports d'azote par voies naturelles et anthropiques et constituent de véritables « hot spots » à la dénitrification. Ce processus va, par conséquent, constituer un réel frein naturel à l'eutrophisation (Seitzinger 1988, Howarth et al. 1996). Lorsque les apports allochtones de nitrate sont faibles, le processus de dénitrification est principalement lié au couplage nitrification/dénitrification (Jenkins & Kemp 1984).

Dans les sédiments marins intertidaux, la bioturbation et les apports en oxygène en surface des sédiments sont généralement importants et favorisent la synthèse de nitrate

et sa pénétration dans les couches profondes du sédiment et donc la dénitrification (Gilbert et al. 1995).

La dénitrification est le processus à l'origine des principaux flux de N_2O depuis le milieu marin vers l'atmosphère. Le N_2O est un gaz à effet de serre très puissant (270 fois plus réactif que le CO_2). L'accumulation de ce composé dans l'atmosphère participe à la destruction de la couche d'ozone (Lacis et al. 1981, Conrad 1996, Bonin et al. 2002). L'oxyde nitreux est responsable d'environ 5% de l'effet de serre lié aux activités humaines dont 20% sont dus au milieu marin.

Le processus de dénitrification est un processus ubiquiste réalisé par une communauté taxonomiquement très diversifiée aux métabolismes variés. L'utilisation du nitrate comme accepteur terminal d'électron en absence d'oxygène est possible chez une large gamme de microorganismes : des *Archeae*, des *Bacteria* mais aussi chez quelques Eucaryotes retrouvés dans des sédiments marins, notamment des foraminifères appartenant aux genres *Globobulimina*, *Nonionella* et *Stainforthia* (Risgaard-Petersen et al. 2005). Les bactéries hétérotrophes dénitrifiantes sont principalement hétérotrophes anaérobies facultatives mais il existe aussi une dénitrification autotrophes. Canfield et al. 2005 ont répertorié les principaux genres bactériens dénitrifiants et leurs métabolismes dans le tableau I.1 qui suit :

Tableau I.1 Exemples de genres bactériens dénitrifiants et leurs principaux métabolismes

	Genres	Source d'énergie	Source de carbone
<i>Archeae</i>			
	<i>Halobacterium</i>	Chemoorganotrophe	Hétérotrophe
	<i>Pyrobaculum</i>	Chemoorganotrophe	Hétérotrophe
<i>Bacteria</i>			
	<i>Pseudomonas</i>	Chemoorganotrophe	Hétérotrophe
	<i>Aquaspirillum</i>	Chemoorganotrophe	Hétérotrophe
	<i>Azospirillum</i>	Chemoorganotrophe	Hétérotrophe
	<i>Alcaligenes</i>	Chemoorganotrophe	Hétérotrophe
	<i>Rhodobacter</i>	Photolithotrophe	Autotrophe
	<i>Beggiatoa</i>	Chemolithotrophe	Autotrophe
	<i>Thiobacillus</i>	Chemolithotrophe	Autotrophe
	<i>Thioploca</i>	Chemolithotrophe	Autotrophe
	<i>Paracoccus</i>	Chemolithotrophe	Autotrophe

La large dispersion phylogénique des dénitrifiants rend l'étude de cette communauté difficile sur la base du gène codant pour l'ARNr 16S, ce qui conduit à rechercher de nouveaux marqueurs spécifiques ciblés sur les gènes de fonction. La réduction dissimilatrice du nitrate en nitrite représente la première étape enzymatique de la dénitrification (ainsi que la RDNA), elle est réalisée par 2 nitrate réductases (*Nap* et *Nar*). Le nitrite ainsi formé est transféré dans le périplasme pour entrer en contact avec une nitrite réductase. Deux nitrate réductase (*Nir*) distinctes en terme de structure sont répertoriées : Cu-*Nir* (encodée par le gène *nirK*) et cd1-*Nir* (nitrite reductase à cytochrome encodée par le gène *nirS*) (Braker et al. 2000, Goregues et al. 2005). La réduction du nitrite produit l'oxyde nitrique (NO, toxique pour la cellule) pour lequel une élimination rapide est nécessaire pour la cellule. L'oxyde nitrique réductase (*Nor*)

est une enzyme de type cytochrome bc codée par les gènes *norB*, *norC*, *norZ*, *norE* et *norF* (Heiss et al. 1989). La conversion de l'oxyde nitreux (N_2O) en diazote (N_2) constitue la dernière étape de la dénitrification. L'enzyme qui catalyse cette réduction, l'oxyde nitreux réductase (N_2OR) codée par le gène *nosZ* (Heiss et al. 1989, Desnues et al. 2007).

La réaction complète de dénitrification permet la synthèse de 24 moles d'ATP (contre 32 moles dans le cas de l' O_2) (Fig. I.2).

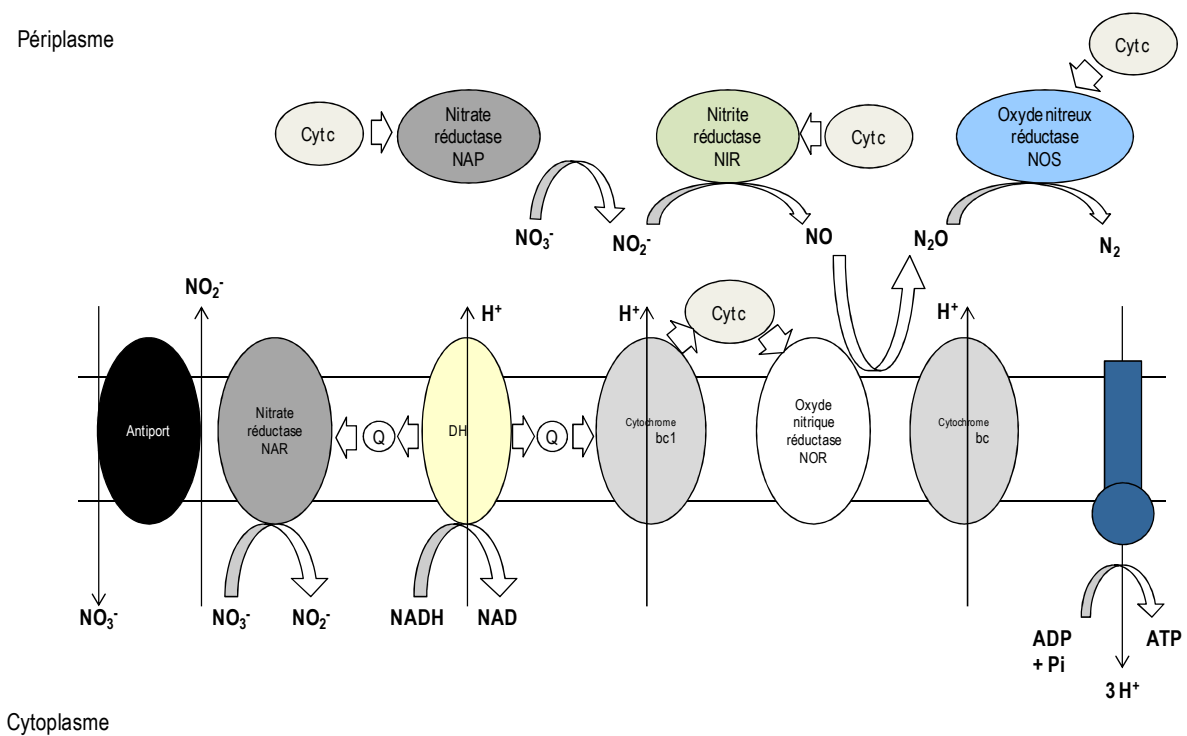


Fig. I. 2 Chaîne de transport d'électrons des bactéries dénitrifiantes (Minjeaud et al. 2008).

Les taux de dénitrification sont influencés par de nombreux paramètres environnementaux, comme les concentrations en oxygène, en nitrate et en matière organique, le pH, la température et la présence de macrofaune ou bioturbation (Herbert

1999). Dans les sédiments marins, la régulation de la dénitrification est régulée principalement par trois facteurs : l'oxygène, le nitrate et la matière organique.

La concentration en oxygène dissous du milieu contrôle la dénitrification soit :

(1) Directement en inhibant les réactions de réduction de la dénitrification. En effet, la présence d'oxygène va engendrer son utilisation préférentielle en fonction des potentiels énergétiques. De plus, l'oxyde nitreux réductase est particulièrement sensible à la concentration en oxygène et son inhibition est effective lors de conditions de microaérophilie (Bonin & Gilewicz 1991). Par conséquent, en présence de faibles teneurs en oxygène, le N_2O peut être le produit final de la dénitrification (on parle de dénitrification incomplète) (Bonin et al. 2002).

(2) Indirectement par son action sur le processus d'oxydation de l'ammonium en nitrate (nitrification).

L'apport en nitrate est souvent décrit comme un facteur limitant de la dénitrification. La production du nitrate issue de la nitrification dans les couches superficielles oxygénées est considérée comme la source majoritaire du nitrate lors du couplage nitrification/dénitrification (Jenkins & Kemp 1984). Cependant, Barnes et Owens estiment que seulement 50% des variations de taux de dénitrification sont imputables aux variations de nitrate laissant penser que les autres facteurs de régulation sont nombreux (Barnes & Owens 1998).

La quantité de matière organique est certainement un facteur important dans la régulation de la dénitrification, étant donné que ce processus est majoritairement hétérotrophe. Dans les sédiments pauvres en carbone organique et riches en nitrate, l'ajout de matière organique va stimuler la dénitrification. A l'inverse, dans un sédiment

pauvre en nitrate, l'ajout de matière organique va indirectement agir négativement sur la dénitrification en inhibant la nitrification (Capone 2000). Cependant, Barnes et al. (1998) ont montré une absence de corrélation entre dénitrification et quantité de matière organique, preuve de la prise en compte de la qualité de la matière organique et de sa biodisponibilité. De plus, l'augmentation de la quantité de matière organique pourrait favoriser les bactéries fermentatives et par conséquent la RDNA au profit de la dénitrification.

Les autres facteurs (température, pH et bioturbation) peuvent également influencer les taux de dénitrification. En effet, Seitzinger et al. ont montré que l'activité de dénitrification augmentait avec la température et qu'elle montrait des profils saisonniers (Seitzinger et al. 1984). Les variations du pH ont généralement peu d'influence sur la dénitrification, sauf en milieux moins tamponnés où des corrélations positives ont été observées entre les taux de dénitrification et l'augmentation du pH. Enfin, la bioturbation et la bio-irrigation, engendrées par l'activité de la macrofaune, sont susceptibles de modifier l'activité dénitrifiante en augmentant la surface d'échange à l'interface eau/sédiment. Ainsi, le nitrate est susceptible de diffuser plus facilement vers les couches anoxiques. L'oxygénation va favoriser le couplage nitrification/dénitrification et donc l'activité de dénitrification (Gilbert et al. 1997).

1.5.2 Anammox :

Durant les dernières décennies, notre compréhension du cycle de l'azote, de ses processus et particulièrement ceux concernant l'élimination de l'azote de l'écosystème a radicalement changé. Dès le milieu des années 60, les océanographes ont constaté des déficits omniprésents en ammonium dans des eaux anoxiques, faisant allusion à son éventuelle élimination via le processus de dénitrification (Francis et al. 2007). En effet,

la dénitrification a longtemps été considérée comme le seul processus capable d'entraîner une perte d'azote pour l'écosystème. La première preuve d'une oxydation anaérobie de l'ammonium en N_2 (ou anammox) a été observée dans des bioréacteurs lors de traitement d'eaux usées (Mulder et al. 1995) où de nouveaux organismes ont été identifiés comme étant capables d'oxyder l'ammonium en présence de nitrite comme accepteur terminal d'électron (Francis et al. 2007).



L'anammox est donc une source supplémentaire de N_2 et modifie la vision traditionnelle du cycle de l'azote où la dénitrification était l'unique processus de perte d'azote dans l'écosystème (Trimmer et al. 2003). Après sa mise en évidence dans le milieu naturel, le rôle de l'anammox et son importance n'ont cessé d'être discutés (Trimmer et al. 2006). A ce jour l'anammox a été étudiée dans différents écosystèmes y compris les sédiments marins, côtiers et estuariens (Thamdrup & Dalsgaard 2002, Trimmer et al. 2003, Risgaard-Petersen et al. 2004, Rysgaard et al. 2004, Engstrom et al. 2005, Minjeaud et al. 2008), les eaux anoxiques (Dalsgaard et al. 2003), les zones d'oxygène minimum au large de l'Afrique Ouest et le Pérou (Kuypers et al. 2003, Hamersley et al. 2007), les mangroves (Meyer et al. 2005), des glaces arctiques (Rysgaard et al. 2004) et des lacs d'eau douce (Schubert et al. 2006). Cependant, les différentes études montrent des résultats très variables (Tableau I.2), l'importance relative de l'anammox par rapport à la dénitrification variant entre 0 et 100%.

Tableau I.2 Importance relative du processus d'anammox dans les flux de N₂ (par rapport à la dénitrification)

Sites		% anammox dans les flux de N ₂	Références
Eaux			
	Zone à oxygène minimum (côte péruvienne)	0.8-3%	Hamerslay et al. 2007
	Lac Rassnitzer (Allemagne)	0-100%	Hamerslay et al. 2009
Sédiments			
	Mer du Nord	2.67%	Thamdrup et Dalgaard, 2002
	Estuaire de la Tamise (Angleterre)	8%	Trimmer et al. 2003
	Estuaire de Colne (Angleterre)	0.30%	Dong et al. 2009
	Sédiments du Fjord de Randers (Danemark)	5-24%	Risgaard-Petersen et al. 2004
	Mer de Norvège	4-79%	Engstrom et al. 2005
	Mer du Greenland (glaces arctiques)	1-35%	Rysgaard, 2004
	Baie côtière du Costa Rica	19-35%	Dalsgaard et al. 2003
	Mangrove	1-9%	Meyer et al. 2005
	Lac de Tanganika (eau douce)	13%	Schubert et al. 2006

Les microorganismes capables de réaliser le processus d'anammox, présentent un certain nombre de caractéristiques qui leur sont uniques, telles que l'utilisation de l'hydrazine (N₂H₄, qui est le carburant pour les fusées) en tant que catabolite intermédiaire, la présence d'un organite, l'anammoxosome dans le compartiment

intracytoplasmique et la biosynthèse d'un lipide particulier situé au niveau de la membrane de l'anammoxosome : le ladderane (Francis et al. 2007). L'anammoxosome est un compartiment cellulaire qui occupe environ 30% de la cellule et où se déroule la conservation d'énergie. La membrane de l'anammoxosome contient les ladderanes qui forment une membrane imperméable protégeant le reste de la cellule des intermédiaires cellulaires toxiques (Jaeschke et al. 2009)(Fig. I.3).

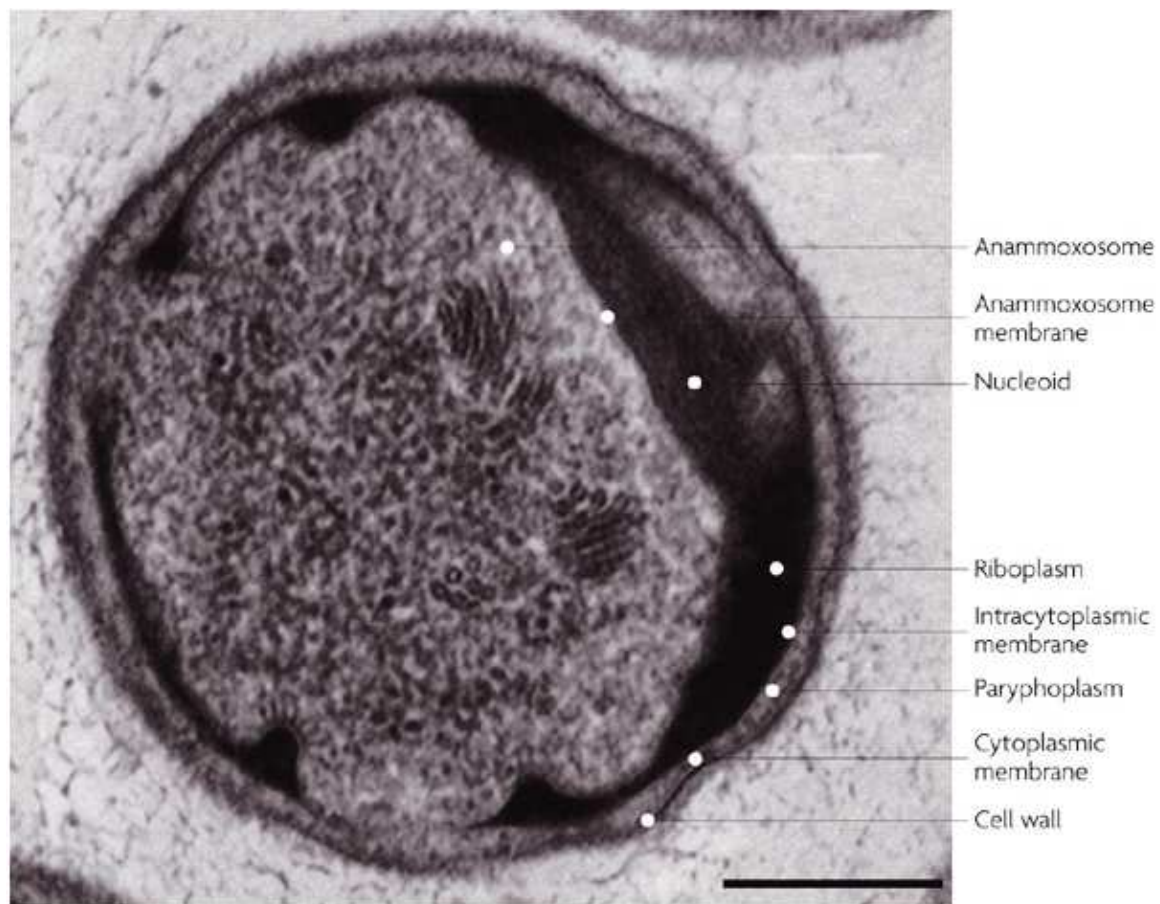


Fig. I. 3 Photo en microscopie à transmission d'une cellule de *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* montrant certains compartiments cellulaires, notamment l'anammoxosome (Kuenen 2008).

Les bactéries capables de réaliser l'anammox forment une branche monophylétique dans le phylum des planctomycètes, sont chimiolithoautotrophes anaérobies et

présentent des temps de génération très longs (jusqu'à 3 semaines) (Jetten et al. 1998). Ces bactéries anammoxifiantes sont rattachées à cinq genres *Candidatus* : *Brocadia*, *Kuenenia*, *Scalindula*, *Anammoxoglobus* et *Jettenia*. Tous ces genres ont été découverts dans des systèmes de traitement d'eaux usées. Après avoir mis en évidence l'activité, la présence des bactéries anammoxifiantes a été confirmée dans la colonne d'eau de la mer Noire (Kuypers et al. 2003), puis retrouvée dans une large variété d'écosystèmes (Tableau I.2). En plus de leur large distribution, les bactéries anammoxifiantes semblent être beaucoup plus ubiquistes qu'on ne le pensait : ces microorganismes sont capables de coupler l'oxydation de nombreux acides organiques à la réduction du nitrate ou RDNA en réduisant donc le NO_3^- en NH_4^+ (Kartal et al. 2007): *Candidatus Anammoxoglobus propionicus* était en compétition avec d'autres bactéries anammoxifiantes ainsi que des bactéries dénitrifiantes pour l'oxydation du propionate en présence d'ammonium, nitrite et nitrate (Kartal et al. 2007). Ces organismes réalisent aussi la respiration des oxydes de fer et de manganèse (Strous & Jetten 2004).

Plusieurs scénarios d'oxydation de l'ammonium à partir du nitrate ou du nitrite ont été proposés, établissant ainsi deux réactions probables (Thamdrup & Dalsgaard 2002):



Les calculs stœchiométriques établissent que la réaction (2) est la plus favorable. Par conséquent, la disponibilité du nitrite dans le milieu va être un facteur important dans le processus d'anammox (Thamdrup & Dalsgaard 2002). Dans les milieux où les concentrations en nitrite sont extrêmement faibles (tels que les sédiments côtiers), les

processus capables de produire du nitrite (nitrification et/ou dénitrification) sont susceptibles d'impacter l'anammox (Dalsgaard et al. 2005).

Au cours de la réaction d'anammox, le nitrite, accepteur terminal d'électrons, est réduit en hydroxylamine grâce à une enzyme membranaire, une nitrite réductase cytochrome c. l'oxyde nitrique, NO, et non l'hydroxylamine, serait l'intermédiaire de la réaction. L'hydroxylamine ou l'oxyde nitrique, s'associe à l'ammonium afin de former l'hydrazine. Cette voie métabolique permet la synthèse de N_2 à partir de NO_2^- et de NH_4^+ (Fig. I.4).

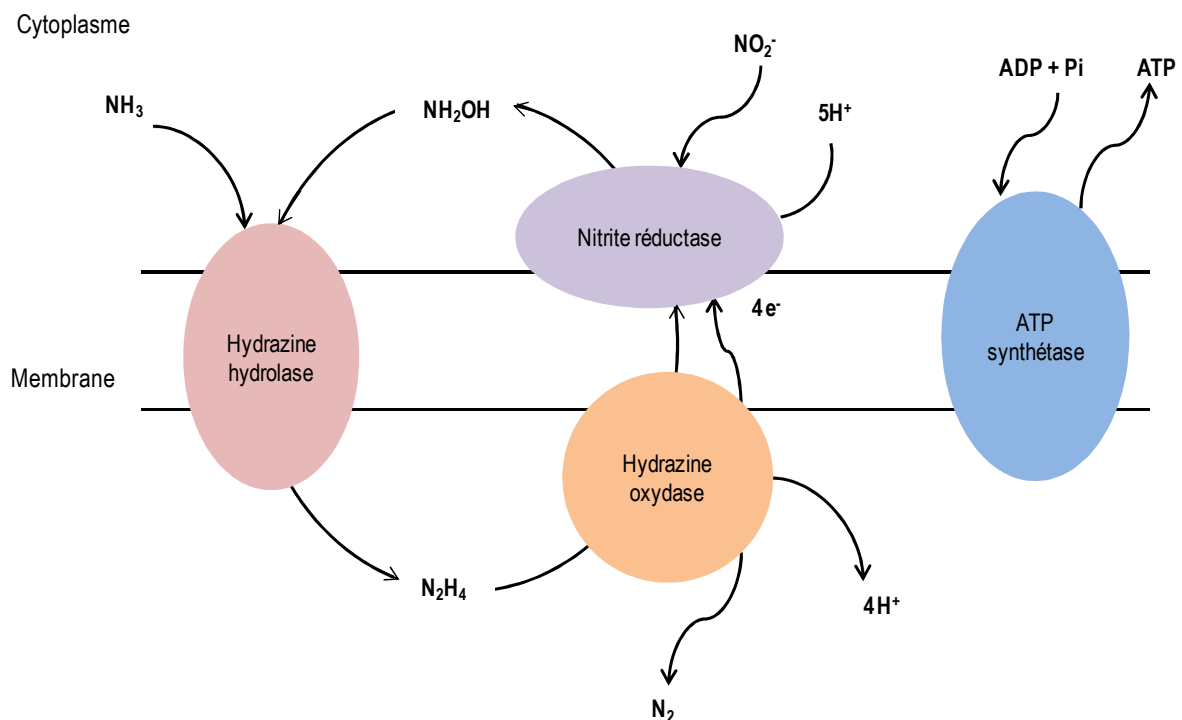


Fig. I. 4 Voie biochimique du processus d'anammox (Jetten et al. 2001).

Un intérêt particulier a été porté sur l'oxydation de l'hydrazine en N_2 puisque cet intermédiaire est généralement connu comme un poison pour la plupart des organismes vivants. L'enzyme réalisant cette réaction d'oxydation peut être l'hydroxylamine oxydoréductase (HAO) ou l'hydrazine déshydrogénase (Schmid et al. 2008). Compte

tenu du manque de spécificité des amorces codant pour l'ARNr 16S des bactéries anammoxifiantes, l'étude des couples d'amorces du gène *hzo* codant pour la HAO a permis de mettre en évidence les bactéries anammoxifiantes dans l'environnement (Quan et al. 2008).

Les variations spatio-temporelles de l'anammox sont contrôlées par certains facteurs. Comme pour la dénitrification, l'oxygénation va être un facteur clé dans la régulation de l'anammox. En effet, le processus d'anammox s'exprime uniquement en anaérobiose, il est inhibé par la présence d'oxygène mais cette inhibition est réversible pour des concentrations en O₂ supérieures à 0.5% de la saturation en air (Strous et al. 1999).

A l'inverse de la dénitrification, les microorganismes anammoxifiants ont besoin d'apports constants d'azote sous des formes oxydées pour maintenir l'expression de leurs enzymes. L'ammonium n'étant jamais limitant, la disponibilité du nitrite va être le principal facteur limitant l'anammox (Meyer et al. 2005). L'anammox est, par conséquent, un processus dépendant des processus susceptibles de produire du nitrite (c'est-à-dire les processus de nitrification et de dénitrification) (Risgaard-Petersen et al. 2004).

La matière organique a également un effet sur la production de diazote via anammox. L'impact des quantités de matière organique sur l'intensité de l'anammox fait débat. En effet, certains auteurs soulignent que de faibles concentrations en matière organique seraient favorables au processus d'anammox (Strous & Jetten 2004), alors que d'autres études montrent une stimulation de l'anammox liée à l'augmentation de la quantité de matière organique (Trimmer et al. 2003).

En milieu naturel, la température a un effet sur l'activité d'anammox et en fonction des sites d'échantillonnage, les bactéries anammoxifiantes sont actives entre 6 et 43°C avec un optimum à 37°C (Kuenen 2008), mais ce processus a également été observé dans les sources chaudes à 52°C (Jaeschke et al. 2009) et dans des événements hydrothermaux à 85°C (Byrne et al. 2009).

2. Echanges de sels nutritifs à l'interface eau-sédiment

Dans les écosystèmes lagunaires, où la profondeur est faible et où la zone intertidale est prolongée, le sédiment devient l'unité centrale des cycles biogéochimiques et le lieu d'une intense productivité biologique. De nombreuses études ont montré la complexité des interactions et l'importance des échanges entre les sédiments et la colonne d'eau (Deborde et al. 2008). L'échange des éléments biogéniques à l'interface eau-sédiment est l'un des principaux facteurs régissant les cycles biogéochimiques dans les écosystèmes côtiers et estuariens (Kristensen 1985). En effet, les conditions de la qualité d'eau à l'interface eau-sédiment ont tendance à influencer les processus et les cycles biogéochimiques dans les sédiments ; le phosphore est typiquement libéré du sédiment en conditions anoxiques. Le nitrate est diffusé dans le sédiment quand il est présent à de fortes concentrations dans la colonne d'eau et pourrait, par conséquent, être dénitrifié, la minéralisation de la matière organique dissoute étant moins efficace en conditions anoxiques (Cowan & Boynton 1996).

Le couplage entre les processus benthiques et les échanges avec l'eau est lié à la production benthique, au dépôt de matière organique et à sa minéralisation, à la libération des sels nutritifs inorganiques et à leur diffusion du sédiment vers la colonne d'eau. Ainsi les sédiments sont soit des puits, soit des sources d'éléments nutritifs

provenant des apports externes et des processus biogéochimiques internes (Deborde et al. 2008).

Les sels nutritifs sont transportés en permanence dans les fonds des lagunes par brassage. Grâce à divers processus biologiques, physiques, chimiques et mécaniques, les sels nutritifs peuvent être libérés et ramenés à nouveau à la colonne d'eau. Ce cycle entre les sédiments et la colonne d'eau peut se produire selon divers schémas dépendants du type de lagune et des conditions au fond. La morphologie des lagunes, les régimes de température, la salinité, les niveaux trophiques et les types de sédiments, le temps de résidence et les conditions hydrologiques peuvent fortement influencer les pools de sels nutritifs et les taux de renouvellement (Forsberg 1989).

Les différentes activités des macrophytes, des invertébrés benthiques et des bactéries, ainsi que l'influence de la température, de la salinité, des valeurs du pH, des teneurs en eau, de la composition de la matière organique et des éléments sédimentaires montrent la complexité des cycles des sels nutritifs (Forsberg 1989).

Les processus benthiques du cycle de l'azote font l'objet d'une attention particulière car la libération des composés azotés pourrait contribuer aux demandes de la production primaire pélagique (Blackburn & Henriksen 1983, Seitzinger 1988). La force conductrice du cycle de l'azote benthique est la dégradation de la matière organique déposée à la surface du sédiment. L'ammonium, minéralisé à partir de la matière organique peut être soit libéré du sédiment, soit adsorbé par les particules sédimentaires soit utilisé dans les processus microbiens. La nitrification se déroule dans la partie oxygénée du sédiment, où les bactéries nitrifiantes oxydent l'ammonium en nitrate. Comme pour l'ammonium, le nitrate peut diffuser à l'interface eau-sédiment ou dans les couches profondes anoxiques du sédiment, où il peut être réduit par des microorganismes dénitrifiants. Les

produits de la dénitrification, N_2 ou N_2O , peuvent être libérés de la colonne d'eau vers l'atmosphère (Lohse et al. 1993). En dehors de la nitrification dans les sédiments, l'interface eau-sédiment peut également être une source importante de nitrate pour la dénitrification, particulièrement dans les zones côtières qui reçoivent des apports importants en sels nutritifs via les rivières et les eaux de ruissellement (Nishio et al. 1983).

3. Production nouvelle et production régénérée

Le cycle de l'azote contrôle la disponibilité des composés azotés et la productivité biologique dans les systèmes marins. Il est généralement admis que la majorité des microorganismes peuvent utiliser l'azote inorganique sous forme de nitrate, de nitrite et d'ammonium (Zehr & Ward 2002).

La concentration et la disponibilité des composés azotés sont d'importants facteurs contrôlant la production primaire dans les eaux de surface de l'océan mondial (Ward et al. 1989). Dans certaines régions côtières, la mort, la lyse et la décomposition des organismes vivants sont des sources d'azote appelé azote régénéré (tel que l'ammonium) et qui est produit *in situ* par des processus hétérotrophes (Dugdale 1986). Les apports en nitrate proviennent généralement des couches profondes ou des eaux de ruissellement. Ils sont ensuite mélangés dans la zone euphotique pour être, par la suite, consommés par le phytoplancton.

Nitrate et ammonium sont souvent présents à de faibles concentrations comparées à d'autres composés azotés (Amino acides, urée, N_2 , etc), mais sont rapidement recyclés dans la chaîne trophique.

Il est généralement admis que les microorganismes utilisent aussi bien le nitrate et l'ammonium comme source d'azote mais diffèrent dans leurs cinétiques d'uptake dans l'utilisation de ces sels nutritifs (Zehr & Ward 2002). Dans les communautés microbiennes *in situ*, les rôles des microorganismes dans l'uptake du NO_3^- et du NH_4^+ diffèrent du fait des contraintes génétiques, biochimiques et physiologiques.

Un modèle comprenant production primaire, stockage des flux de particules et du cycle de l'azote illustre la croissance du phytoplancton comme étant la résultante des sources nouvelles d'azote (qu'on appelle production nouvelle) et la croissance qui résulte de l'azote déjà présent ou produit par régénération (appelé production régénérée).

La production nouvelle, principalement incorporée sous forme de NO_3^- et de N_2 (Dugdale 1986), est assurée par le transport vertical et conduit par des mécanismes de forçage physiques. En revanche, l'azote régénéré, recyclé sous forme de NH_4^+ et d'azote organique dissous, est produit *in situ* par des activités hétérotrophes (telle que la minéralisation) (Ward et al. 1989).

4. Présentation de l'étang de Berre

4.1 Caractéristiques géographiques et climatologiques :

L'étang de Berre est une vaste lagune de 155 km², localisée dans le département des Bouches du Rhône. Il s'agit d'une lagune saumâtre, semi-fermée, qui communique avec la mer Méditerranée (dans sa partie Sud Ouest) par le canal de Caronte. L'étang est constitué de deux parties : le Grand étang à l'Ouest et l'étang de Vaïne à l'Est. Il est bordé au Sud Est par l'étang de Bolmon (Fig. I.5). Le volume d'eau de l'étang de Berre est estimé à 900 millions de m³ pour des profondeurs moyennes de 6 m et maximales de 9 m.

Le climat de la zone est typiquement méditerranéen avec des étés chauds et secs, des hivers moyennement rigoureux et des pluies parfois torrentielles au printemps et en automne. La moyenne annuelle des précipitations est comprise entre 500 et 600 mm. La zone est également soumise à une intense évaporation (1300 à 1500 mm par an). D'une manière générale, la température moyenne varie autour de 5 à 10°C durant l'automne et l'hiver, et de 20 à 25 °C durant l'été. Les vents dominants sont le mistral (venant des terres par le Nord et le Nord-Ouest) et les vents marins (Sud et Sud-Est). Le mistral souffle, en moyenne annuelle, un jour sur trois, à une intensité moyenne de 23 km/h, avec des rafales atteignant parfois 100 km/h. Les vents Sud et Sud-Est ont une intensité moyenne de 10 km/h.

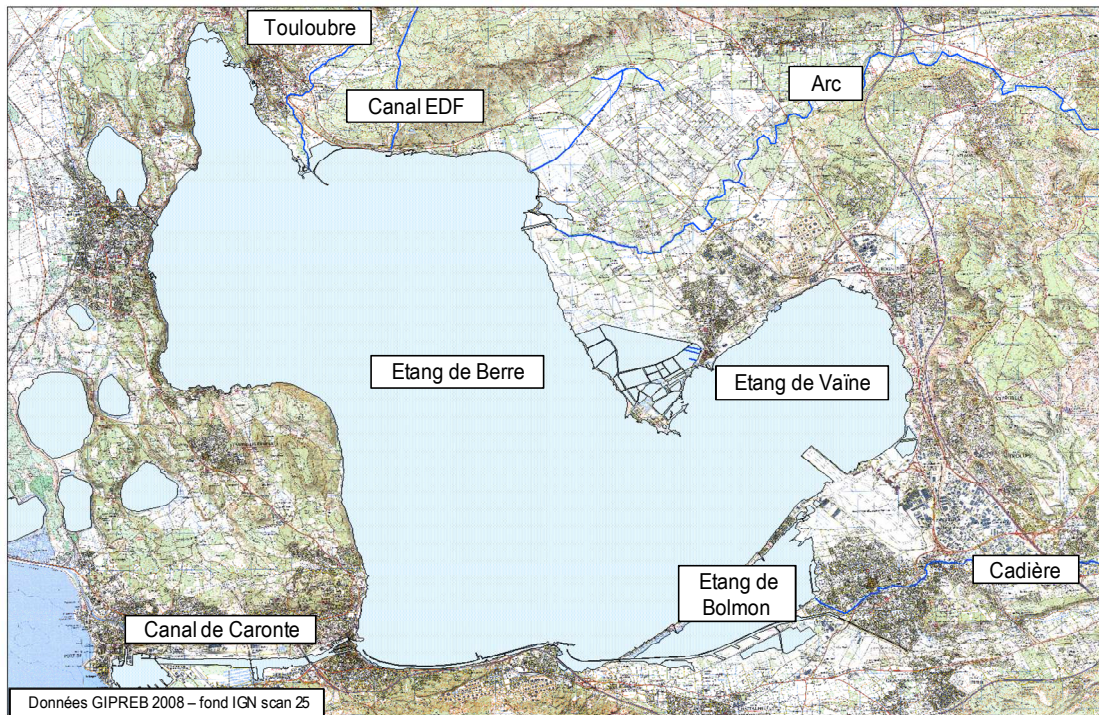


Fig. I. 5 Localisation de l'étang de Berre

4.2 Les apports en eau douce :

4.2.1 Les apports naturels :

Doté d'un bassin versant naturel d'une surface d'environ 1600 km², l'étang de Berre constitue un réceptacle d'eau douce en provenance des affluents pluviaux (100 millions de m³ en 2008, 125 millions de m³ en 2009 et 93 millions de m³ en 2010) et des affluents naturels (1012 millions de m³ en 2008, 254 millions de m³ en 2009 et 238 millions de m³ en 2010). Les principaux affluents naturels de l'étang sont les rivières de l'Arc et de la Touloubre (Fig. I.6) qui se déversent au Nord du grand étang.

Le bassin versant de l'étang de Berre se divise en bassin versant direct et en sous-bassins versants correspondants aux zones drainées par l'Arc et la Touloubre :

- L'Arc présente le plus grand sous-bassin versant de l'étang de Berre (730 km²). Son débit moyen, calculé sur 38 ans de mesures par la banque hydrologique, est de 3.48 m³.s⁻¹ (<http://www.hydro.eaufrance.fr>). Quarante huit pour cent de la surface du bassin de versant de l'Arc est recouverte par des forêts et des milieux semi-naturels. Trente huit pour cent sont recouverts de terres agricoles et 13% de territoires artificialisés. On dénombre également 14 stations d'épuration sur ce bassin versant.
- La Touloubre présente un bassin versant qui recouvre 400 km². Quarante cinq pour cent de la surface du bassin versant de la Touloubre sont occupés par l'agriculture et 12% sont recouverts de territoires artificialisés. Les eaux usées sont traitées par 7 stations d'épuration.

4.2.2 Les apports de la centrale hydro-électrique de Saint Chamas :

Mise en service en 1966, la centrale hydroélectrique sous la gestion d'EDF se situe au Nord de l'étang de Berre. Elle rejette via le canal usinier de la Durance des eaux douces dont une partie sert pour l'irrigation des cultures maraîchères de cette zone, l'autre partie est dérivée vers l'étang de Berre (841 millions de m³ dans la saison 2007/2008, 997 millions de m³ en 2009 et 952 millions de m³ (fin Novembre 2010).

Ces apports d'eau douce (naturels ou par la centrale EDF) sont chargés en sels nutritifs (azote, phosphore), en limons, et en autres polluants (agricoles, industriels et urbains). Ils présentent une forte variabilité saisonnière et inter-annuelle engendrant une forte dégradation du milieu.

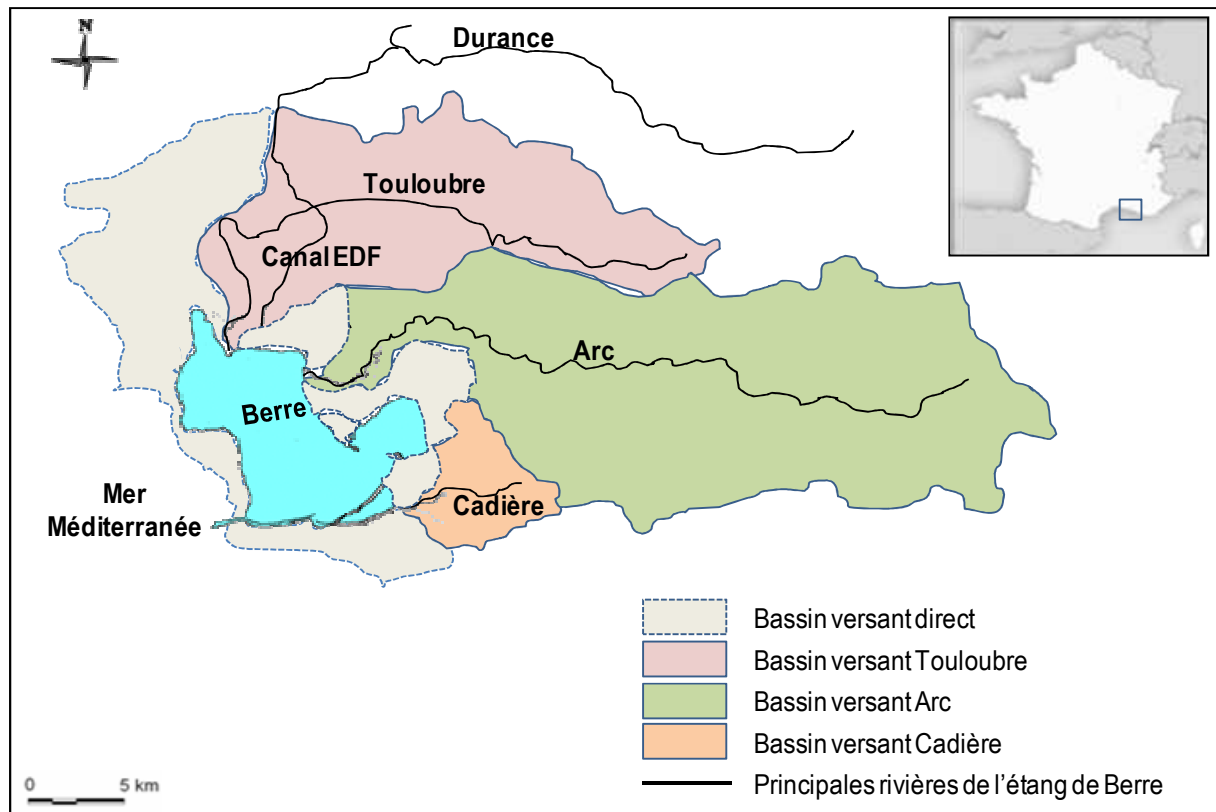


Fig. I. 6 Les bassins versants de l'étang de Berre.

4.3 Récapitulatif historique des événements ayant marqués l'écologie de l'étang de Berre :

- Avant 1925 : l'étang de Berre est un milieu saumâtre très riche, avec des étendues de macrophytes et des peuplements denses. La salinité est relativement constante, avec des variations spatiales et saisonnières liées aux variations des régimes des cours d'eau. A partir du 20^{ème} siècle, la zone de l'étang de Berre devient un site stratégique pour l'implantation d'activités économiques.
- 1925 : afin de faciliter le passage des navires à fort tirant d'eau, le canal de Caronte est approfondi à -9 m. Mise en service du canal du Rove qui garantit une continuité fluviale entre le Rhône et Marseille.

- 1920-1930 : implantation des raffineries Shell (au Nord de l'étang) et Total (au Sud de l'étang).
- 1957 : interdiction de la pêche à cause d'une contamination de la chair des poissons par les rejets industriels. Aucune restriction à ces rejets n'ayant été imposée auparavant.
- 1963 : effondrement du canal du Rove. Les échanges hydriques via ce canal sont complètement interrompus.
- 1966 : mise en service de la centrale hydroélectrique de Saint Chamas qui utilise l'étang de Berre comme milieu récepteur, suite au détournement de la Durance, de considérables quantités d'eau (en moyenne 3.3 milliards de m³ d'eau douce par an entre 1966 et 1993, soit 3.7 fois le volume de l'étang) et de sédiments (520 000 tonnes par an sur la même période) y sont déversées.
- 1970-1980 : développement du complexe de sidérurgie et explosion démographique dans la zone. Mise en place d'un plan de réduction des pollutions industrielles.
- 1980 : limitation des rejets des limons par le canal EDF après la mise en service d'un bassin de délimonage des eaux de la Durance.
- 1993-1994 : le Plan Barnier impose les premiers quotas des rejets d'eau douce, les apports sont réduits à 2.7 puis à 2.1 milliards de m³ sur un an et à 0.4 milliard de m³ entre le 1^{er} Mai et le 30 Septembre. Pour les rejets en limons, un quota annuel de 200 000 tonnes a été fixé. Un suivi écologique de l'étang est mis en place.
- 2004 : la Cour de Justice des communautés européennes condamne l'état français pour manquement aux obligations du protocole d'Athènes : absence

d'autorisation de rejet conforme et insuffisance des mesures prises pour limiter la pollution dans l'étang de Berre.

- 2005 : dans le cadre du contentieux européen, EDF applique de nouvelles modalités de rejets : un quota annuel de rejets de limons est fixé à 60 000 tonnes et un quota annuel d'eau douce de 1.6 milliards de m³.
- Après 2005 : les apports en eau de la Durance par le canal usinier de Saint-Chamas ont été régulés à 1.2 milliards de m³ par an (1.14 milliard de m³ en 2010). Les valeurs de salinité à l'étang de Berre sont maintenues entre 15 et 25. Les rejets directs des stations d'épuration dans l'étang sont aux normes.

4.4 Détérioration de l'état écologique de l'étang de Berre :

L'étang de Berre, dont les rives et le bassin versant ont été fortement industrialisés et urbanisés tout au long du 20^{ème} siècle, présente un niveau de détérioration important. En simplifiant, on peut distinguer trois types de dégradation écologique dans l'étang de Berre : la contamination chimique, les apports excessifs et variables en eau douce et l'eutrophisation.

4.4.1 La contamination chimique :

Elle est directement liée à la vocation industrielle des rives de l'étang. Entre 1930 (période d'installation des premiers sites pétrochimiques) et 1970, aucune réglementation n'imposait des limites aux niveaux de rejets. La pollution par les hydrocarbures et les métaux lourds (plomb, mercure, cadmium, etc) était telle que la pêche dut être interdite en 1957 (GIPREB 2010). Les sédiments du fond de l'étang gardent toujours la trace de cette contamination chimique dangereuse pour la santé humaine et l'environnement.

Depuis 1994, et la mise en place d'un programme de réduction des rejets industriels (Plan Régional d'Élimination des Déchets Industriels Spéciaux), la situation s'est améliorée. La pêche professionnelle a pu être rétablie en 1994.

4.4.2 Apports en eau douce :

Les apports massifs en eau douce ont conduit à une forte diminution de la salinité de l'étang. Les valeurs de salinité présentent d'importantes variations saisonnières en relation avec le débit de la centrale EDF. En effet, la centrale est plus active l'hiver pour répondre aux besoins en électricité ; en été, l'eau du canal est utilisée pour les besoins de l'irrigation. Les débits du canal EDF agissent donc sur la salinité comme des amplificateurs des conditions de précipitation et d'évaporation. Ces oscillations de la salinité rendent l'écosystème instable (disparition de plusieurs espèces marines, régression des herbiers, etc.).

De plus, la répartition spatiale et temporelle de la salinité dans l'étang de Berre permet de distinguer deux grandes masses d'eau : dans la région Nord peu profonde (1 à 5 m), une fine couche d'eau douce se mélange progressivement à une masse d'eau saumâtre et évolue vers le Sud, région plus profonde (au-delà de 6 m), où on observe plutôt une stratification haline profonde de la colonne d'eau (autour de 7-8 m) : une masse d'eau saumâtre surplombe une couche d'eau marine, entrée par le canal de Caronte. La propagation vers le Nord de cette masse d'eau marine, est, entre autres, fonction de l'activité de turbinage de la centrale EDF. L'existence d'une telle barrière de densité s'oppose aux échanges physiques et chimiques entre les deux masses d'eau.

4.4.3 L'eutrophisation :

Le fonctionnement de l'étang de Berre, est fortement perturbé par l'accroissement considérable des activités humaines et par conséquent des rejets des polluants qui a conduit à une dégradation progressive de la qualité du milieu notamment l'eutrophisation. Ce processus d'enrichissement en éléments nutritifs (azote, phosphore), fortement dépendant des apports issus des bassins versants, stimule le développement des macrophytes et du phytoplancton et conduit à des crises d'anoxie. En effet, lorsque la quantité en sels nutritifs apportée par le bassin versant de la lagune est importante, le phytoplancton et les macrophytes opportunistes (généralement du genre *Ulva*), se développent (Fig. I.7). La prolifération du phytoplancton engendre une augmentation de la turbidité des eaux lagunaires, défavorable aux phanérogames et aux autres macrophytes. Au niveau des sédiments, la quantité de matière organique issue des végétaux en décomposition, augmente de même que l'activité respiratoire des bactéries aérobies.

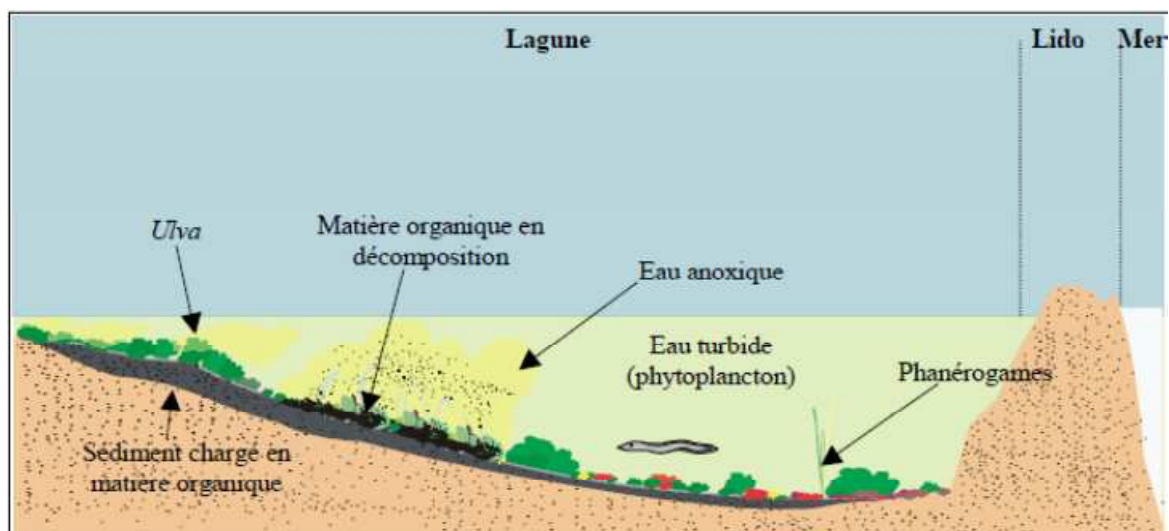


Fig. I. 7 Description simplifiée d'une lagune eutrophisée (Souchu et al. 1998a).

L'oxygène qui est utilisé comme accepteur d'électrons pour oxyder la matière organique, disparaît donc progressivement.

L'anoxie apparaît d'abord dans les sédiments puis dans l'eau (Souchu et al. 1998b). En effet, la quantité d'oxygène dissous dans l'eau résulte du bilan entre la consommation (processus aérobies de dégradation de la matière organique et respiration), la production primaire (photosynthèse), et les échanges au niveau de l'interface air-eau. Plus la température est élevée plus la quantité d'oxygène dissous dans l'eau est faible. La quantité d'oxygène dissous dans l'eau ne permet donc plus le maintien des organismes vivants. La macroflore et la macrofaune ne pouvant plus respirer, meurent massivement et constituent un autre stock de matière organique pouvant par la suite être minéralisé (ou oxydé) (Cépralmar et al. 2006).

Parmi les mécanismes conduisant à l'eutrophisation, on cite :

- Le confinement statique de la masse d'eau dû au pourtour terrestre de la lagune. La faible dispersion permet aux algues en développement de rester dans la masse d'eau où les conditions sont propices en termes d'éclairement, de température et de sels nutritifs. Dans des milieux plus ouverts, des conditions hydrodynamiques particulières, telles que la présence de fronts ou de stratifications thermiques ou halines, confèrent une plus grande stabilité verticale, stabilité qui est vraisemblablement une condition nécessaire au développement des efflorescences de dinoflagellés notamment.
- L'éclairement, nécessaire à la photosynthèse, est meilleur dans les zones peu profondes. Dans les lagunes, le confinement en surface par un front de densité assure au phytoplancton de surface un éclairement moyen plus élevé qu'en zone non stratifiée, sauf dans le cas de très forte charge particulière.

- Des apports en sels nutritifs en excès qui proviennent de l'atmosphère (par des dépôts secs et humides), de la mer (par les volumes d'eau échangés entre la lagune et la mer qui sont associés à des éléments dissous et particuliers. Ces échanges peuvent conduire à un enrichissement ou un appauvrissement en sels nutritifs selon leurs concentrations et les volumes échangés). Les apports en sels nutritifs peuvent également provenir du continent (80% des apports de contaminants à l'environnement marin ont pour origine les activités humaines par l'intermédiaire des eaux de ruissellement, des rejets urbains et industriels, des rivières et des aquifères, source majeure des apports en sels nutritifs dans la lagune).

4.5 Devenir des sels nutritifs :

Les apports en sels nutritifs (azote et phosphore) provenant de sources ponctuelles (pluies) ou diffuses (rivières) varient dans le temps (Tournoud et al. 2005). Leurs comportements sont le résultat d'une combinaison d'un certain nombre de variables (pH, potentiel redox, la morphologie et l'hydrologie des rivières, le temps de résidence, le débit d'eau, etc.).

Howarth et Marino ont montré que le contrôle de l'azote dans les eaux côtières constitue une part essentielle dans la réduction de l'eutrophisation (Howarth & Marino 2006). En effet, dans la zone euphotique, l'azote se répartit en quatre compartiments (selon Dugdale 1986) :

- Les sources d'azote pour le phytoplancton et les procaryotes (azote minéral et gazeux).
- Les producteurs primaires (azote organique particulaire).

- Les organismes hétérotrophes.
- L'azote détritique (azote organique dissout et particulaire) issu de la dégradation de la matière organique et du métabolisme des organismes autotrophes et hétérotrophes.

Divers processus biologiques interviennent dans le transfert de l'azote d'un compartiment à un autre :

- La transformation de l'azote inorganique dissout en azote organique particulaire se fait par absorption par le phytoplancton.
- Ces organismes autotrophes sont ensuite consommés par les organismes des échelons supérieurs, conduisant à une transformation de l'azote en ammonium et en urée (directement par excrétion ou indirectement par dégradation bactérienne de leur détritus).

Des activités microbiennes participent à la transformation, l'accumulation et la régénération de l'azote (la nitrification, la dénitrification, l'anammox, l'ammonification, la réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium, etc.) dans la colonne d'eau et dans le sédiment (Fig. I.8).

- L'activité phytoplanctonique intervient dans la production de matière organique dissoute qui peut être soit assimilée par les bactéries et donc retourne dans la chaîne trophique soit exportée dans les eaux plus profondes.
- Au cours de la sédimentation, une fraction dégradable s'accumule dans le fond, est régénérée et est à nouveau disponible au phytoplancton. L'autre fraction sédimente et s'accumule dans la masse d'eau profonde et dans le sédiment.

L'ensemble de ces nuisances menace le maintien des lagunes littorales et les activités qui en dépendent (la pêche, la baignade, les activités nautiques).

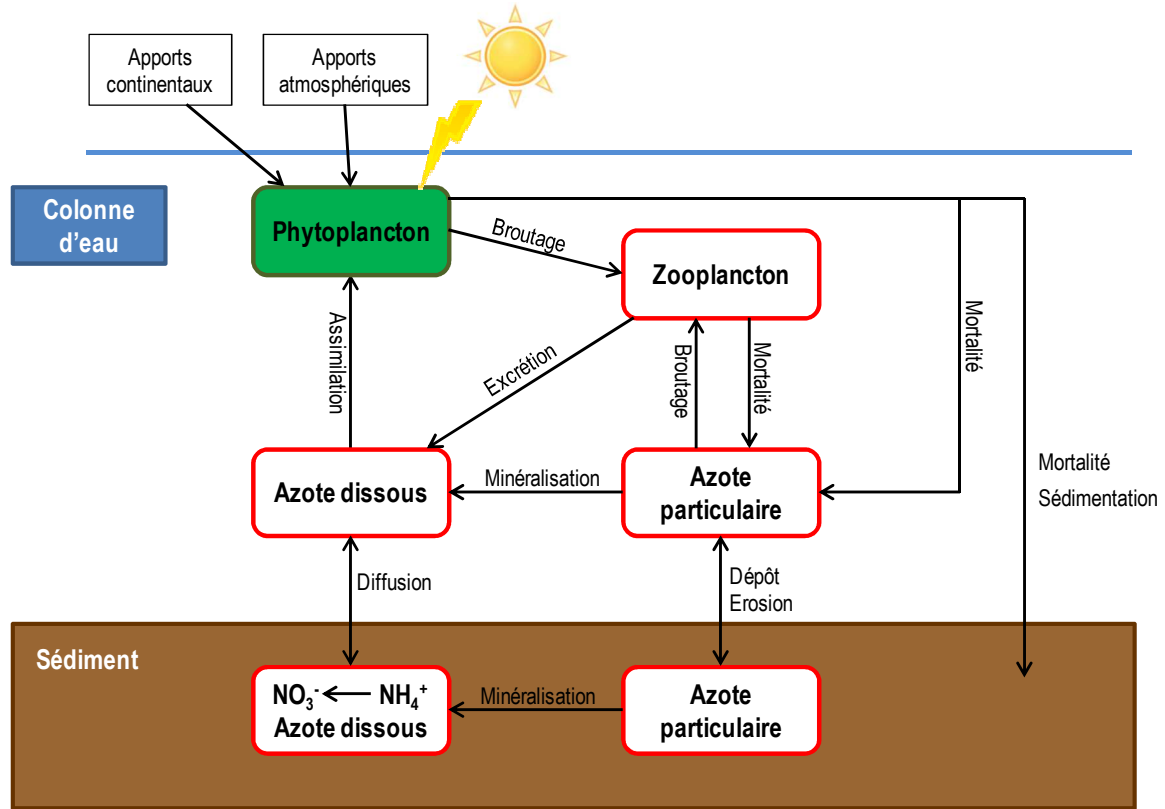


Fig. I. 8 Schéma conceptuel du cycle de l'azote dans le sédiment et la colonne d'eau.

5. Changements de salinité dans les systèmes lagunaires

Les lagunes occupent environ 1/8 des zones côtières mondiales et sont présentes depuis les tropiques jusqu'aux pôles. Les écosystèmes qu'elles abritent sont fertilisés par des apports océaniques et continentaux, et comptent parmi les plus productifs de la biosphère. Leur maintien et les processus au sein même de l'écosystème sont contrôlés par des interactions complexes entre le continent, l'océan et l'atmosphère. Ces zones côtières font, de ce fait, partie des environnements les plus changeants et les plus vulnérables sur Terre (Viaroli et al. 2007). En effet, ces changements pourront se dérouler à l'échelle de la journée ou de l'heure en fonction de la lumière, la température, le vent, les courants, l'action des marées et les processus biogéochimiques (Rysgaard et al. 1999). Les lagunes sont directement liées à leurs environnements chimiques et physiques, faisant d'elles des systèmes ouverts et dynamiques soumis à des pressions naturelles (courants, épisodes de crue, élévation du niveau de la mer, marées, énergie solaire, pluies, entrées d'eau marine, apports d'eau des rivières, apports en matière organiques et en sels nutritifs) (Castel et al. 1996, Viaroli et al. 2007, Crossland et al. 2005). Ces pressions naturelles sont interconnectées entre elles et sont souvent liées à l'impact des activités humaines. En effet, l'augmentation progressive de la densité de population sur les côtes et le développement des activités urbaines, industrielles, agricoles, portuaires, aquacoles, de pêche et leurs rejets respectifs, rend ces écosystèmes particulièrement sensibles.

Les lagunes ne sont pas des milieux homogènes ; elles reçoivent l'azote et le phosphore inorganiques sous des formes oxydées en provenance du milieu marin environnant qui sont par la suite régénérés sous des formes réduites tel que l'ammonium qui est la forme

prépondérante de l'azote et ses concentrations dans le sédiment sont élevées. En revanche, les concentrations en nitrate sont généralement faibles. Dans la colonne d'eau, les faibles concentrations en phosphate peuvent être expliquées par son adsorption par la matière particulaire et le sédiment. Toutefois, la régénération du PO_4^{2-} pourrait expliquer la grande variation observée lors de la mesure de ces concentrations. Les apports continentaux proviennent principalement des rivières, et à moindre échelle, des eaux souterraines et des apports atmosphériques. Ces apports en eau douce sont accompagnés par de grandes quantités de matière particulaire (argile, détritiques, etc.), de matière organique dissoute et de sels nutritifs (Castel et al. 1996) (Fig. I.9). Ces apports vont conduire à une forte production primaire, et lorsque la consommation d'oxygène liée à la dégradation de la matière organique est plus importante que la production d'oxygène par la photosynthèse, les lagunes sont alors soumises à des crises d'hypoxie, voire d'anoxie (Zillen et al. 2008).

Au sein d'une lagune, on peut donc distinguer une zonation en fonction du degré de confinement, c'est-à-dire du taux de renouvellement de l'eau lagunaire par l'eau de mer. Par ailleurs, dans le cas des lagunes où l'arrivée d'eau douce est importante (par exemple, l'étang de Berre, la lagune de Venise en Italie ou encore la lagune d'Urbinu en Corse), il existe une zone de transition entre les écosystèmes d'eau douce impactés par les apports des cours d'eau, et les écosystèmes lagunaires caractérisés par une salinité intermédiaire (entre l'eau douce et l'eau de mer) ou par de fortes fluctuations de la salinité. On observe donc un gradient de salinité entre l'eau douce et l'eau de mer.

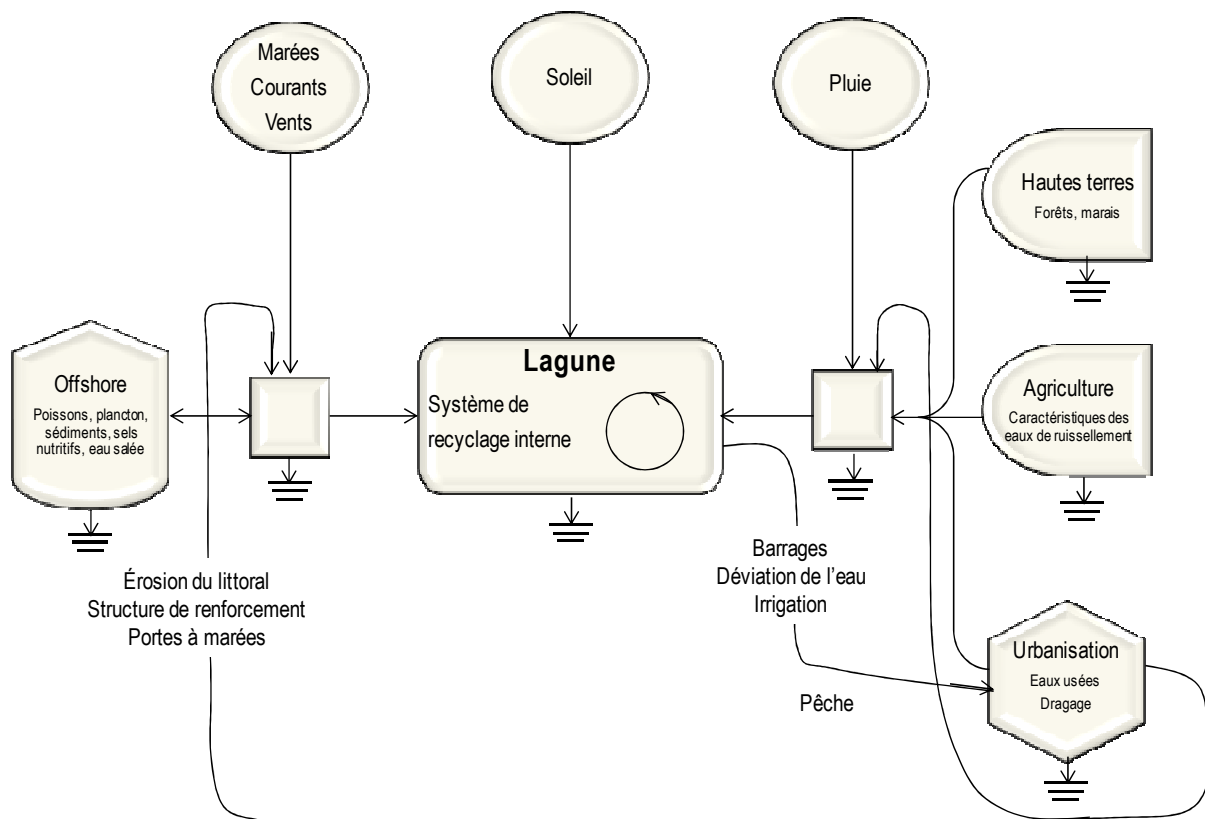


Fig. I. 9 Interactions de la lagune avec la mer, le continent et l'atmosphère (Castel et al. 1996).

Les lagunes côtières sont donc caractérisées par un régime de salinité naturelle en constante fluctuation. La plupart des fluctuations des salinités *in situ* sont en réponse à la circulation habituelle au sein d'une lagune et aux effets combinés de la marée, des vents et des apports d'eau douce, qui peuvent affecter la structure annuelle de la salinité dans les lagunes (Sikora & Kjerfve 1985, Wong 1995).

Au cours des étés méditerranéens longs et secs, les pertes d'eau par évaporation sont supérieures aux apports par précipitation et ruissellement des rivières. La lagune devient plus salée, pouvant dépasser la salinité de la mer et atteindre dans certains cas, l'hypersalinité (Largier et al. 1997). Durant l'hiver, les lagunes méditerranéennes

reçoivent souvent des apports significatifs en eau douce, de telle sorte que la lagune est excédentaire en eau. Il en résulte une stratification des couches d'eau : l'eau douce, plus légère que l'eau salée, constitue la couche de surface et se déverse en mer ; l'eau de mer, plus salée, pénètre dans la lagune en profondeur. Cette stratification de la colonne d'eau va empêcher tout mélange et échange entre la surface et le fond, et par conséquent empêche la diffusion des gaz, notamment l'O₂, conduisant à de fréquents épisodes d'hypoxie (Gouze et al. 2008b).

La salinité peut, dans ces cas, jouer un rôle crucial dans l'importance relative des processus d'un écosystème (Rysgaard et al. 1999, Sumner & Belaine 2005). Différentes corrélations et variations ont été observées entre la salinité et le cycle de l'azote. Les fluctuations de salinité peuvent jouer un rôle dans le contrôle des flux d'azote dans le sédiment, elles peuvent intervenir dans la capacité d'adsorption de l'ammonium par le sédiment et semblent être spécifiques du site d'étude. En effet, des tendances opposées ont été rapportées ; pour la dénitrification, aucun effet de la salinité n'a été remarqué pour certaines zones côtières ou estuariennes (Nielsen et al. 2001, Fear et al. 2005, Magalhaes et al. 2005), alors que d'autres études ont montré une relation inverse entre les taux de dénitrification et la salinité (Rysgaard et al. 1999, Laverman et al. 2007, Giblin et al. 2010). La nitrification peut être stimulée (Magalhaes et al. 2005) ou inhibée lorsque la salinité augmente (Rysgaard et al. 1999, Campos et al. 2002, Bernhard et al. 2007b). Giblin et al. (2010) ont montré que la RDNA était fortement corrélée à la salinité. Les fluctuations de salinité peuvent, en effet, induire des stress biologiques conduisant soit à des variations de la taille et de l'efficacité des communautés (Jackson & Vallaire 2009), soit à des shifts dans ces communautés (Coci et al. 2005). Cependant, il est difficile d'évaluer l'impact direct des changements de salinité sur l'écosystème et particulièrement sur le cycle de l'azote lors d'études *in situ* vu que de nombreux

paramètres environnementaux et chimiques varient ou interagissent au sein d'une lagune (Rysgaard et al. 1999, Jackson & Vallaire 2009).

6. Réponse des lagunes côtières face aux perturbations

Les lagunes côtières sont considérées comme des environnements fortement imprévisibles. De plus, il a été montré qu'en dessous de certains seuils de tolérance des perturbations, les écosystèmes et les communautés sont résilients face à certains stress environnementaux et peuvent amortir les effets de ces facteurs de stress (Viaroli et al. 2007). En effet, face à une perturbation du milieu, les écosystèmes naturels y compris les lagunes, répondent de manière non linéaire. Les réponses sont souvent brusques et d'une grande intensité, c'est-à-dire que des stress croissants pourraient conduire à un régime shift et une détérioration irréversible de l'écosystème. A ces caractéristiques s'ajoute la fragilité notable des écosystèmes lagunaires. Il est, par conséquent, probable que parmi les écosystèmes marins méditerranéens, les lagunes côtières seraient les premières à réagir face aux tendances du changement climatique (Tableau I.3) et des perturbations anthropiques (Bernasconi et al. 2005).

Tableau I.3 Effets directs du changement climatique sur le fonctionnement des lagunes côtières (processus et propriétés physiques) (Bernasconi et al. 2005).

Facteurs du changement climatique	Effet des facteurs de changement climatique sur le fonctionnement des lagunes côtières						
	Température de l'eau de la lagune	Salinité	Sels nutritifs	Pénétration de la lumière	Oxygène	Sédimentation	Apports d'eau dans la lagune
Niveau de l'eau de mer		Changement de la salinité suite à l'augmentation du niveau de la mer					Augmentation des apports à cause de la rupture de la barrière séparant la lagune de la mer
Température de l'air et de la mer	L'augmentation de la température est amplifiée dans les systèmes côtiers				Diminution de la solubilité de l'oxygène si la température augmente		
Précipitations		La salinité est inversement liée aux apports d'eau douce	Augmentation des apports en sels nutritifs quand les crues sont plus importantes	Augmentation de la matière en suspension lors des événements de crues	Diminution de la solubilité de l'oxygène quand la stratification de l'eau augmente	Flux sédimentaires sont inversement liés aux précipitations	La variabilité des précipitations augmente la variabilité des apports
Tempêtes		Salinité plus importante à cause de la rupture de la barrière séparant la lagune de la mer				Augmentent le transport des sédiments	Augmentation des apports à cause de la rupture de la barrière lagune / mer

6.1 Dynamiques de résilience et régimes shifts dans les écosystèmes :

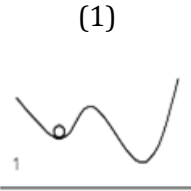
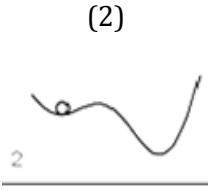
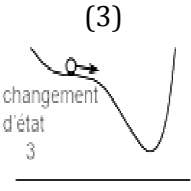
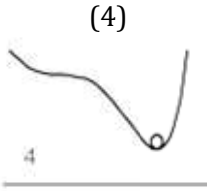
La relation entre structure et fonctionnement est l'un des principes fondamentaux de l'écologie. Les écosystèmes sont des systèmes complexes adaptatifs, au sein desquels les propriétés macroscopiques (la structure trophique, les relations diversité-productivité, et les modalités de circulation des nutriments) sont issues des interactions entre les éléments et dont le développement, peut être influencé par ces propriétés (Levin 2001). Tous les écosystèmes sont régulièrement exposés à des faibles changements des apports en sels nutritifs, à la fragmentation des habitats ou à l'exploitation biologique. Les écosystèmes répondent alors progressivement et régulièrement à ces changements graduels. Cependant, des études menées sur des lacs, des récifs coralliens, des lagunes, des mers, des océans, des forêts et des zones arides ont montré que ces faibles changements progressifs peuvent être interrompus par des changements brusques et drastiques (ou shifts) qui pourraient conduire à un état écologique non désiré. Bien que divers événements puissent déclencher de tels changements, des études récentes ont montré qu'une perte de la résilience peut également favoriser le basculement de l'état pionnier vers un autre état alternatif (Folke et al. 2004).

Walker et al. (Walker et al. 2004) ont défini la résilience comme étant l'amplitude maximale d'une perturbation, pour laquelle le système a la capacité de se réorganiser tout en maintenant la même fonction, structure, identité et réactions. De plus, la résilience reflète le degré avec lequel un écosystème peut augmenter sa capacité d'apprentissage et d'adaptation face à une perturbation (Levin 2001, Carpenter et al. 2002, Folke et al. 2004).

Dans certains cas, un écosystème peut subir une perturbation dont l'amplitude est supérieure à sa capacité d'adaptation et de reconstruction. Cette perturbation soudaine

est souvent accompagnée par des changements brusques dans les réactions de l'écosystème de telle sorte qu'on peut assister à un basculement de l'écosystème pionnier vers un autre écosystème alternatif (Scheffer et al. 2001).

Tableau I.4 Etats alternatifs dans une diversité d'écosystèmes (1,4) avec les causes (2) et les déclencheurs (3) impliqués dans la perte de résilience et le changement d'état (Folke et al. 2004)

	Etat initial: 1er domaine de stabilité (bassin d'attraction profond)	Modification des paramètres environnementaux --> diminution de la profondeur du bassin d'attraction	Déclencheurs de changement du domaine de stabilité	2ème domaine de stabilité (bassin d'attraction plus profond que le précédent)	Références
Etats alternatifs de	(1) 	(2) 	(3) 	(4) 	(Folke et al. 2004, milieu 2010)
Exemples	Lacs à eaux claires	Accumulation du phosphore dans les sols agricoles et les sédiments des lacs	Apports en sels nutritifs	Lacs à eaux turbides	(Scheffer & Carpenter 2003)
	Mers et zones côtières à eaux claires, herbiers submergés, favorables aux espèces de poissons	Accumulation du phosphore et de l'azote ainsi que d'autres éléments chimiques, forts épisodes de crues	Eutrophisation, désalinisation, diminution des concentrations en O ₂ dans la colonne d'eau	Milieus eutrophes, eaux turbides, anoxie, blooms planctoniques	(Gunderson et al. 2002)
	Récifs coralliens	eutrophisation littorale	Maladie, blanchissement des coraux	Récifs dominés par les algues	(Bellwood et al. 2004)

Les conditions externes à l'écosystème (tels que le climat, les apports en sels nutritifs ou en produits chimiques, la perte de la diversité spécifique, etc.) changent souvent de manière progressive dans le temps. Certains écosystèmes répondent continuellement à ces changements, alors que d'autres peuvent être résistants, mais réagissent plus

fortement lorsque les conditions atteignent un seuil critique. En effet, suite à ces perturbations, l'écosystème peut présenter deux états stables (ou domaines de stabilité, Tableau I.4), séparés par un équilibre instable qui marque la frontière entre deux bassins d'attraction différents (Scheffer et al. 2001).

Un bassin d'attraction est une région dans l'espace d'état dans laquelle un système tend à se maintenir. Pour les systèmes évoluant vers un équilibre, l'état d'équilibre est défini comme un attracteur, et le bassin d'attraction présente toutes les conditions initiales qui mènent à l'état d'équilibre (Walker et al. 2004).

La diminution de la profondeur du bassin d'attraction (état 2, Tableau I.4) représente une perte de la résilience de l'écosystème considéré. Elle se produit lentement sous l'action d'un ou de plusieurs facteurs environnementaux. Le changement d'état de l'écosystème (état 3, Tableau I.4) (la bille qui glisse dans un nouveau bassin d'attraction), sera provoqué par un événement soudain qui peut, à son tour, être très rapide (Folke et al. 2004).

Au fil du temps, la capacité des écosystèmes à faire face aux changements en combinant les impacts top-down (par exemple la surexploitation des grands prédateurs) et bottom-up (par exemple l'excès des apports en sels nutritifs) a diminué. Les écosystèmes deviennent imprévisibles et leurs fonctions et leurs services deviennent aléatoires (Folke et al. 2004).

Pour qu'un écosystème se maintienne à l'état initial, le changement des variables qui déterminent les limites au-delà desquelles les perturbations peuvent faire basculer le système vers un autre devrait être pris en considération (Scheffer & Carpenter 2003). Par conséquent, les efforts visant à réduire le risque des shifts entre les états de

l'écosystème devraient plutôt tenir compte de la vitesse des changements qu'essayer de contrôler les perturbations et les fluctuations (Gunderson et al. 2002).

6.2 Dynamiques de résilience et biodiversité :

On distingue deux aspects de la diversité : (1) la diversité des groupes fonctionnels ou des espèces au sein des groupes fonctionnels et (2) la diversité des réponses fonctionnelles (Luck et al. 2003, Folke et al. 2004).

(1) Diversité des groupes fonctionnels :

Les groupes fonctionnels d'espèces dans un système sont tous les organismes qui contribuent directement dans les taux d'un processus fonctionnel au sein d'un écosystème. Ils comprennent les groupes d'organismes responsables d'une même fonction, par exemple la pollinisation, la fixation d'azote, la décomposition, etc. La persistance des groupes fonctionnels contribue à la performance des écosystèmes et des services qu'ils génèrent. La perte du groupe fonctionnel majeur tels que les tops prédateurs, d'autres consommateurs ou des filtreurs benthiques pourrait causer des altérations drastiques dans le fonctionnement de l'écosystème (Jackson et al. 2001a, Duffy 2002). De plus, dans certains écosystèmes dépourvus de groupes fonctionnels spécifiques, l'addition d'une seule espèce pourrait changer considérablement la structure et le fonctionnement des écosystèmes (Chapin et al. 2000).

(2) Diversité des réponses fonctionnelles :

La variabilité des réponses au sein des groupes fonctionnels face à un changement environnemental est essentielle pour la résilience de l'écosystème (Chapin et al. 1998, Folke et al. 2004). Cette variabilité est définie comme étant la diversité des réponses chez des espèces qui contribuent à la même fonction dans un écosystème face à un

changement environnemental (Elmqvist et al. 2003). Par exemple, dans certains systèmes lacustres, des espèces de zooplancton caractérisées par une forte tolérance aux faibles pH, maintiennent la fonction de broutage du phytoplancton dans des conditions acides (Frost et al. 1995).

6.3 Resistance et résilience des communautés microbiennes :

Les bactéries jouent un rôle fondamental dans les processus écosystémiques. Elles occupent des positions clés dans les processus et sont impliquées dans les transformations biogéochimiques des éléments, notamment N, P et C (Whitman et al. 1998). Dans les écosystèmes aquatiques, leurs capacités métaboliques, permettent l'expression d'une large gamme de processus (Newton et al. 2011). Plusieurs facteurs sont impliqués dans la composition de ces communautés bactériennes c'est à dire la richesse, l'abondance relative et la structure phylogénétique de l'ensemble des taxons. La salinité, le pH, les concentrations en sels nutritifs et les relations trophiques sont parmi les aspects les plus étudiés (Baho et al. 2012).

Néanmoins, les études concernant la résistance et la résilience des communautés microbiennes face aux perturbations demeurent rares (Bowen et al. 2011, Baho et al. 2012). (Allison & Martiny 2008) ont élaboré un plan décrivant la manière avec laquelle les communautés microbiennes du sol pourraient être affectées par une perturbation. Ces auteurs ont émis l'hypothèse que les communautés microbiennes pourraient retrouver leur composition initiale et leur fonction après certaines fluctuations environnementales. Cependant lorsque la composition de la communauté demeure altérée après la perturbation, un degré élevé de redondance fonctionnelle (c'est à dire la capacité d'un taxon microbien d'effectuer un processus fonctionnel au même taux qu'un

autre taxon sous les mêmes conditions expérimentales) entre les communautés microbiennes pourrait permettre le maintien de leur fonctionnement (Baho et al. 2012). Certains groupes microbiens montrent une flexibilité métabolique et une tolérance physiologique face aux changements des conditions environnementales (Meyer et al. 2005), conduisant, ainsi, à des communautés microbiennes résistantes aux changements. De plus, d'autres caractéristiques telles qu'une abondance élevée, une dispersion à grande échelle et une croissance rapide, renforcent l'hypothèse que ces microorganismes pourraient également être résilients face à un changement (Meyer et al. 2005). Enfin, l'adaptation évolutive par le transfert horizontal de gène pourrait permettre aux microorganismes les plus sensibles de s'adapter aux nouvelles conditions environnementales.

La Fig. I.10 illustre les impacts potentiels d'une perturbation sur la composition microbienne et/ou les processus de l'écosystème. Si on considère une perturbation appliquée à un écosystème et ses communautés microbiennes. La composition microbienne peut (a) être résistante à la perturbation et ne pas changer, (b) être résiliente et récupérer rapidement sa composition initiale, (c) être altérée et cependant fonctionner comme la communauté d'origine du fait de la redondance fonctionnelle ou (d) fonctionner différemment dans le cas contraire.

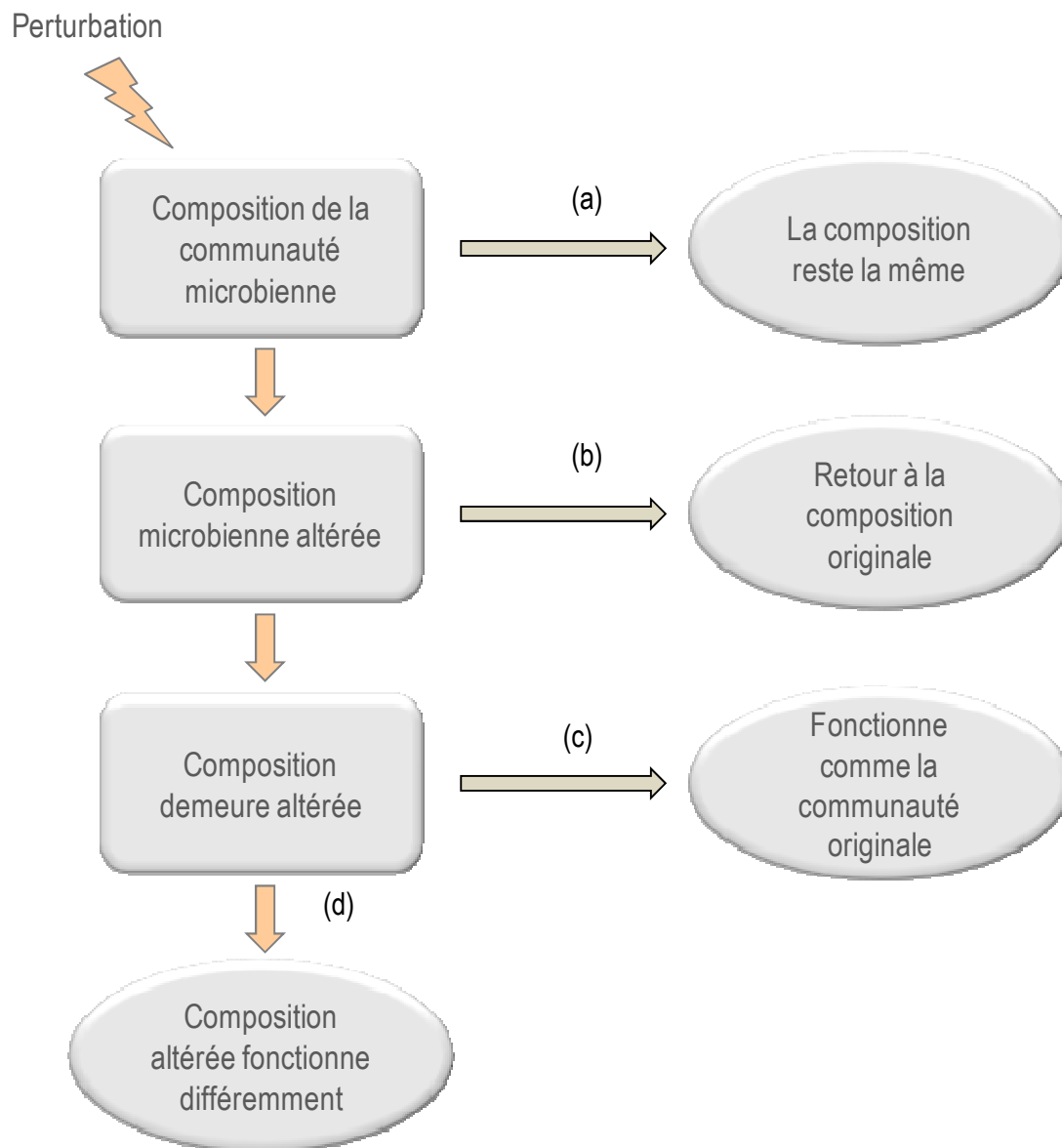


Fig. I. 10 Schéma de la manière dont la perturbation peut induire le changement la composition microbienne et affecter les processus écosystémiques.

Le nombre réduit d'études sur la résistance de la composition microbienne entrave notre capacité à reconnaître toute tendance décrivant cette caractéristique. Cependant, il a été confirmé que la composition microbienne est généralement sensible à la perturbation. En effet, plus de 80% des études sur la fertilisation minérale (N/P/K), la température et la modification du carbone ont montré des effets significatifs de la

perturbation sur la composition microbienne (Allison & Martiny 2008). Malgré la sensibilité de la composition microbienne face à une perturbation, la communauté pourrait être résiliente et retourner rapidement à la composition pré perturbation. Un certain nombre de caractéristiques en particulier chez les *Bacteria* et les *Archaea*, suggèrent que la résilience pourrait être commune à ces microorganismes. En effet, certains microorganismes ont une flexibilité physiologique élevée, c'est le cas des bactéries pourpres non sulfureuses qui peuvent être phototrophes et/ou autotrophes en conditions anoxiques et chemohétérotrophes en conditions aérobies. Par conséquent, même si l'abondance relative de certains taxons diminue initialement, ces taxons peuvent s'acclimater dans le temps, aux nouvelles conditions abiotiques et retrouver leur abondance initiale. Finalement, si l'adaptation physiologique n'est pas possible, alors l'évolution rapide (par les mutations ou par le transfert horizontal de gènes) pourrait permettre aux taxons microbiens de s'adapter à leurs nouvelles conditions environnementales (Allison & Martiny 2008).

Chapitre II

Partie expérimentale

Chapitre II: Partie expérimentale

1. Sites d'échantillonnage :

Le suivi de la salinité, de la température, des concentrations en sels nutritifs et des activités du cycle de l'azote a été réalisé dans deux stations de l'étang de Berre qui se distinguent par des régimes de salinité contrastés : SA1, localisée au Nord de l'étang (point GPS : 43°30'10N, 005°03'10E), est caractérisée par une profondeur de 6 m et des sédiments vaseux. Elle est située en face du canal usinier de la Durance et des embouchures de l'Arc et de la Touloubre. SA3, localisée au Sud de l'étang (43°25'70N, 005°06'90E), présente une profondeur de 9 m et des sédiments sableux. Elle est située en face du canal de Caronte qui relie la lagune à la mer Méditerranée (Fig. II.1).

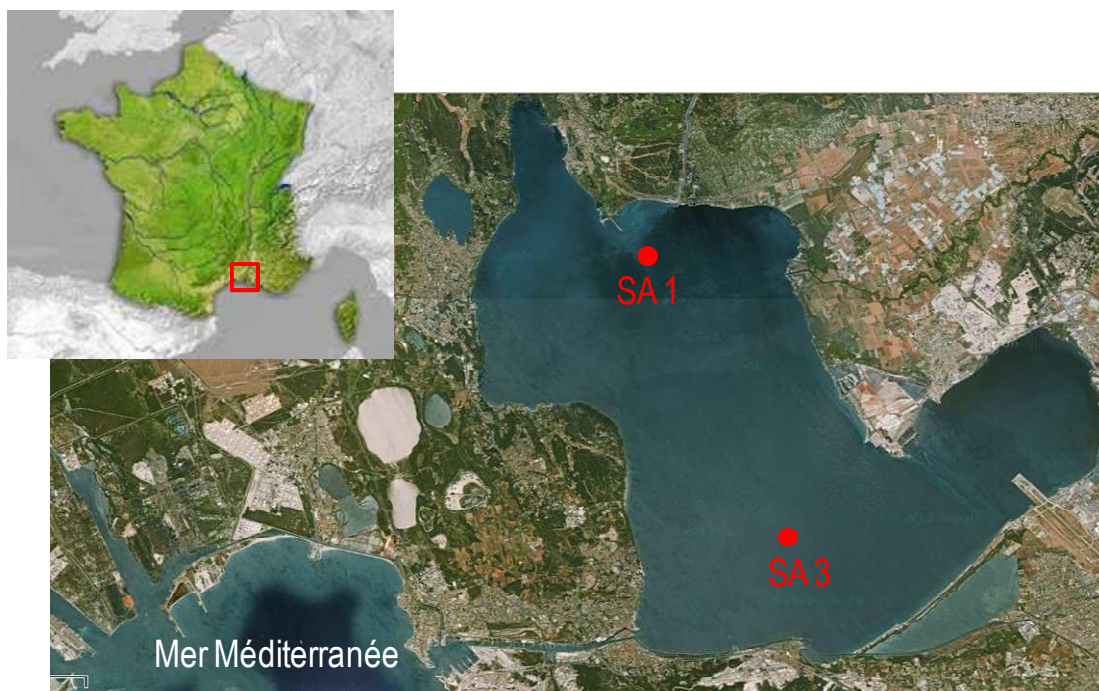


Fig. II. 1 Localisation des stations d'échantillonnage SA1 (43°29.735N, 5°2.953E, ~6m de profondeur) et SA3 (43°25.300N, 5°6.219E, ~9m de profondeur).

2. Echantillonnage :

Les profils verticaux de température et de salinité ont été mesurés à chaque station à l'aide d'une multi-sonde Hydrolab et d'une CTD YSI de la surface vers le fond. L'eau du fond a été prélevée à l'aide d'une bouteille Niskin pour mesurer les concentrations en éléments nutritifs.

Les échantillons de sédiments ont été prélevés durant l'année 2010-2011 dans des carottiers en PVC (10 cm de diamètre et 25 cm de hauteur) pour la mesure in situ des activités et des flux d'azote et pour la réalisation des microcosmes (tableau II.1).

Tableau II.1 Calendrier des prélèvements effectués dans les stations d'échantillonnage SA1 et SA3.

Dates	<i>In situ</i> Mesure des activités et des flux d'azote (Pour SA1 et SA3)	<i>In vitro</i> Réalisation des microcosmes (Fluctuations de la salinité)
	Avril 2010	Mars 2011 (pour SA1)
	Juillet 2010	
	Septembre 2010	
	Novembre 2010	Décembre 2010 (pour SA3)
	Février 2011	
	Avril 2011	

- Mesure des activités et des flux d'azote :

Les carottiers destinés aux mesures des activités et des flux d'azote ont ensuite été sous-échantillonnés avec des tubes acryliques (longueur 12 cm, 3 cm de diamètre interne), la moitié inférieure est remplie avec du sédiment et la moitié supérieure est remplie avec de l'eau du fond. Pour chaque site, un total de 26 sous-carottes a été obtenu à la suite de

chaque campagne d'échantillonnage. Les sous-carottes ont été remplies avec l'eau du fond du site correspondant et aérées pour maintenir les gradients d'oxygène dans les sédiments, à la température ambiante. Avant incubation, les sous-carottes ont été stabilisées pendant 24 heures, dans des aquariums remplis d'eau du fond de la station échantillonnée.

- Réalisation des microcosmes :

Pour chaque station, un ensemble de 5 carottiers en PVC (25 cm de longueur, 10 cm de diamètre interne) a été utilisé pour l'échantillonnage. La moitié inférieure des carottes a été remplie de sédiments, la moitié supérieure étant remplie de l'eau *in situ* pour éviter la saturation des sédiments et des conditions anoxiques pendant le transport.

3. Dosage des composés azotés:

3.1 Dosage des nitrates et nitrites :

Les concentrations en nitrate et en nitrite sont déterminées simultanément à l'aide de l'auto-analyseur Technicon II (Treguer & Le Corre 1975) avec une sensibilité adaptée aux faibles concentrations rencontrées dans certains écosystèmes aquatiques. L'échantillon est séparé en deux : une voie pour le dosage direct du nitrite sur l'échantillon brut et une voie qui permet de réduire le nitrate en nitrite lors du passage dans une colonne cadmium-cuivre. Cette deuxième voie permet le dosage de l'ensemble nitrate + nitrite. Ainsi, la concentration en nitrate est obtenue par différence entre les deux dosages.

Trois réactifs sont nécessaires pour ces dosages :

Le réactif 1 (pour 1 litre) : 5 g de sulfamilamide, 50 mL d'HCl et 1 l de détergent BRIJ.

Le réactif 2 (pour 1 litre) : 500 mg de dichlorure de N-(Naphthl-1) éthylène d'ammonium.

Le réactif 3 (pour 1 litre) : 10 g de chlorure d'ammonium (NH_4Cl), ajusté à pH 8.5 avec de l'ammoniac (le réactif 3 n'est utilisé que pour le dosage du nitrate).

Pour l'eau interstitielle, 5 ml d'eau de mer synthétique dépourvue de nitrate ou de nitrite, ont été ajouté à 5 mL de sédiment, homogénéisé et centrifugé pendant 10 min à 10.000 g. Les concentrations en nitrates et nitrites ont été déterminées dans le surnageant.

3.2 Dosage de l'ammonium :

Les concentrations en ammonium sont déterminées après une extraction de l'ammonium du sédiment. Cinq millilitres de sédiment sont mélangés avec 5 mL de chlorure de potassium (KCl , 2M). Après une incubation de 2 heures à 4°C, la phase liquide est récupérée et le sédiment subit une deuxième extraction dans les mêmes conditions.

Les deux phases liquides sont ensuite réunies avant d'être analysées (Laima 1993). Le dosage est réalisé par spectrophotométrie selon la méthode de Koroleff (Koroleff 1969). Après ajout de 0.3 mL d'un premier réactif (35 g.L⁻¹ de phénol et 0.4 g.L⁻¹ de nitroprussiate) au 3 mL d'échantillon, 0.3 mL d'un réactif oxydant sont ajoutés (280 g.L⁻¹ de trisodium citrate, 22 g.L⁻¹ d'hydroxyde de sodium et 0.38 N d'hypochloride de sodium). Les échantillons sont incubés pendant 5h à 20°C à l'obscurité. Les mesures de densité optique sont réalisées à 640 nm (Kérouel & Aminot 1997).

3.3 Quantification des isotopes de l'azote par spectrométrie de masse:

Dans le but de quantifier simultanément les différents isotopes de l'azote ($^{28}\text{N}_2$, $^{29}\text{N}_2$, $^{30}\text{N}_2$), de l'argon (^{40}Ar) et de l'oxygène ($^{32}\text{O}_2$), 200 μL de la phase gazeuse de l'échantillon sont injectés dans un spectromètre de masse (Spectromètre de masse quadripôle Anagaz 100, MKS, Angleterre). Chaque mesure est réalisée en triplicata afin de prendre en compte la reproductibilité des mesures (Minjeaud et al. 2008, Javanaud et al. 2011). Les mesures des productions de $^{29}\text{N}_2$ et de $^{30}\text{N}_2$ sont accompagnées d'un bruit de fond lié à la présence de fortes concentrations de N_2 dans l'atmosphère, et nécessitent donc d'être corrigées. De plus, l'atmosphère contient naturellement 0.35% de ^{15}N et par conséquent, la quantité naturelle de $^{29}\text{N}_2$ n'est pas négligeable. L'injection de différents volumes d'air permet de quantifier le $^{29}\text{N}_2$ de l'atmosphère en fonction du $^{28}\text{N}_2$. La quantité de $^{29}\text{N}_2$ produite par dénitrification est donc obtenue en soustrayant cette valeur de celle du $^{29}\text{N}_2$ mesurée. La mesure de $^{30}\text{N}_2$ est également biaisée et nécessite l'application d'une correction à la valeur mesurée (Jensen et al. 1996). En effet, lors de la fragmentation dans le spectromètre de masse, de l'oxyde nitrique (NO) est produit et possède une masse atomique de 30. NO est donc mesuré au même temps que le $^{30}\text{N}_2$. L'estimation de la quantité de NO produite par fragmentation est calculée à partir des mesures de $^{28}\text{N}_2$ et $^{32}\text{O}_2$. La quantité de $^{30}\text{N}_2$ produite au cours de la dénitrification est obtenue en retirant cette valeur de la quantité d'oxyde nitrique produit par fragmentation. Les cinétiques de production de $^{29}\text{N}_2/\text{Ar}$ et de $^{30}\text{N}_2/\text{Ar}$ sont déterminées après ajout du $^{15}\text{NO}_3^-$.

L'argon (Ar), troisième constituant de l'atmosphère terrestre (0.96%), est utilisé comme standard interne pour quantifier les concentrations en N_2 mesurées au spectromètre de masse.

3.4 Teneur en matière organique :

Le poids sec a été obtenu en prélevant 2 mL de sédiment qui étaient ensuite pesés et incubés pendant 5 jours à 65°C. La teneur en matière organique par perte au feu a été obtenue après une incubation de 24 h à 550°C.

4. Quantification des activités microbiennes :

4.1 Mesure des flux de N₂ : dénitrification et anammox:

4.1.1 Préparation des échantillons :

Les activités de dénitrification et d'anammox sont mesurées dans des systèmes réactionnels de type carotte (3 cm de diamètre, 12 cm de hauteur, contenant 5 cm de sédiment et 3 cm d'eau). Plusieurs types de techniques peuvent être utilisés pour la mesure des activités, soit en prélevant une tranche de sédiment et la mélangeant à de l'eau (« slurries » anaérobies), soit en gardant l'organisation sédimentaire, utilisant ainsi des carottes intactes. L'utilisation des « slurries » anaérobies a été essentielle pour la découverte de l'anammox dans l'environnement et les données obtenues ont, jusqu'ici, accru nos connaissances sur sa biogéographie et ses processus de régulation. Cependant, leur utilisation perturbe les gradients naturels des substrats et l'équilibre redox des sédiments et par conséquent, détruit le microenvironnement chimique des bactéries. Il est apparu nécessaire d'utiliser des techniques qui permettent de quantifier directement l'anammox et la dénitrification dans des sédiments intacts. Seuls ces moyens de mesure permettront une élucidation et une compréhension complète du cycle de l'azote dans les systèmes aquatiques (Trimmer et al. 2005).

Les carottes ont été fermées par le haut à l'aide d'un bouchon et différentes quantités d'une solution mère de $^{15}\text{NO}_3^-$ (10 mM) y ont été ajoutées au début de la phase d'incubation pour obtenir des concentrations finales en $^{15}\text{NO}_3^-$ de 80 μM , 125 μM et 250 μM . Au cours de l'incubation, l'eau interstitielle des carottes a été délicatement mélangée avec un agitateur magnétique suspendu au bouchon supérieur de la carotte.

Pour chaque temps de la cinétique d'incubation (à 0, 2, 4 et 6 heures), 3 carottes sont arrêtées simultanément par ajout d'acide mercurique (HgCl_2 , 2 mL d'une solution à 0.1 M par système réactionnel). Trois millilitres de phase gazeuse et 3 mL d'eau interstitielle des carottes sont transférés à l'aide de seringues dans des tubes en verre (Venoject®, Terumo) dans le but de mesurer les cinétiques de $^{28}\text{N}_2$, $^{29}\text{N}_2$ et $^{30}\text{N}_2$ au spectromètre de masse.

4.1.2 Réduction du nitrate, dénitrification et anammox :

Des aliquotes de 5 mL de la suspension (mélange de l'eau interstitielle + du sédiment) ont été utilisés pour mesurer les cinétiques de concentration en nitrate. Sa consommation correspond au taux de la réduction des nitrates.

Les cinétiques de production des différents isotopes de N_2 ($^{29}\text{N}_2$ et $^{30}\text{N}_2$) sont calculées en présence des différentes concentrations de $^{15}\text{NO}_3^-$ (80 μM , 125 μM et 250 μM).

Les taux de consommation du substrat ou d'accumulation de produit ont été ensuite tracés en fonction du temps et adaptés sur un modèle linéaire utilisant la méthode des moindres carrés. Les taux ont été calculés à partir de la pente linéaire initiale de la courbe. Les incertitudes des taux ont été extrapolées à partir des résultats des régressions linéaires.

Comme l'activité d'anammox, calculée conformément à Minjeaud et al. (2008), n'a jamais dépassé quelques pour cent des taux de production totale de N_2 , l'activité dénitrifiante a

été quantifiée avec la méthode d'IPM (Isotope Pairing Method) développée par Nielsen (Nielsen 1992) suivant la composition isotopique du N_2 ($^{29}N_2 = ^{14}N + ^{15}N$, $^{30}N_2 = ^{15}N + ^{15}N$) après enrichissement en $^{15}NO_3^-$.

4.2 Réduction Dissimilatrice du Nitrate en Ammonium (RDNA) et nitrification :

Les taux de RDNA et de nitrification ont été mesurés dans des carottes auxquelles on a ajouté 80 μM de $^{15}NO_3^-$. La cinétique de la production d'ammonium a été suivie, en parallèle de l'utilisation du substrat (nitrate). Immédiatement après la fin de l'incubation (0, 2, 4, 6 heures) et l'homogénéisation de l'eau et du sédiment dans les carottes, 3 mL du mélange ont été transférés dans un flacon en verre Duran Schott de 50 mL préalablement rincé à l'acide chlorhydrique (HCl, 10 %).

L'enrichissement en ^{15}N des composés azotés de la fraction dissoute (ammonium, nitrate) ne peut être déterminé qu'après avoir extrait sélectivement ces composés de l'échantillon, et les avoir concentrés sur un support (filtre) approprié à l'analyse isotopique par spectrométrie de masse (Gouze et al. 2008b) Cette extraction est réalisée par diffusion selon une technique mise au point par (Slawyk & Rimbault 1995) et (Rimbault et al. 1999).

L'ensemble des traitements de ces échantillons, pour l'extraction successive de l'ammonium et du nitrate est récapitulé dans le tableau II.2 :

Tableau II.2 Tableau récapitulatif des traitements des échantillons pour la quantification de la RDNA et de la nitrification (D'après Gouze et al. 2008).

Diffusion	Etape	Azote présent dans l'échantillon	Réactif utilisé	Réaction produite	Processus mesuré
1	Extraction de NH_4^+	NH_4^+ NO_3^- NO_2^-	Oxyde de magnésium (MgO)	$\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_3 \uparrow$	Régénération (notamment la RDNA)
2	Extraction de NO_3^-	NO_3^- NO_2^-	Alliage de Devarda	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NH}_4^+$ $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_3 \uparrow$	Nitrification

(↑) diffusion de NH_3 qui est sous forme gazeuse

Dans une première étape, il s'agit d'extraire l'ammonium de l'échantillon après ajout d'oxyde de magnésium (MgO) et de le concentrer sur un filtre pour déterminer l'enrichissement en ^{15}N de ce composé. Avant la mise en diffusion, l'ajout d'azote non marqué (ici 3 μmoles $^{14}\text{N-NH}_4^+$) dans le flacon est nécessaire pour la mesure au spectromètre dans le cas où la quantité d'azote minéral sous cette forme est faible (< à 0,16 μmoles dans 100 mL). En effet, cette quantité supplémentaire (carrier) augmente la quantité absolue d'azote et facilite ainsi l'extraction.

L'ammonium dissous est transformé en ammoniac (NH_3) à pH alcalin. L'ammoniac gazeux est concentré par diffusion sur une portion de filtre acidifié (50 μL de H_2SO_4 à 0,5N) suspendu au bouchon du flacon Duran Schott. Le flacon est fermé hermétiquement, placé pendant une semaine dans une étuve à 60°C et agité tous les jours pour augmenter le rendement de diffusion. Au bout d'une semaine, le filtre est retiré, placé dans un petit tube en verre référencé, et mis à sécher dans une étuve à 60°C . Après cette première étape qui a éliminé l'ammonium, la seule forme d'azote minéral restant dans l'échantillon est le nitrate (et éventuellement du nitrite). L'extraction sélective du nitrate permettra de déterminer l'enrichissement de ce composé. Elle se fait selon le même principe que la première diffusion: le nitrite et le nitrate sont

préalablement réduits en ammonium par ajout d'alliage de Devarda. Puis cet ammonium diffuse en milieu basique (sous forme d'ammoniac) pendant une semaine à l'étuve à 60°C, et est concentré sur un filtre acidifié (50 µL de H₂SO₄ à 0,5N) suspendu au bouchon du flacon Duran-Schott. Au bout d'une semaine, le filtre est retiré et mis à sécher à l'étuve à 60°C.

Les filtres issus des différentes diffusions sont placés dans des capsules en étain. Ces capsules sont déposées dans un échantillonneur (spectromètre de masse Integra CN, SERCON), qui fonctionne au rythme d'un filtre toutes les 6 minutes pour une analyse en azote.

4.3 Ammonification (ammonium produit par minéralisation de l'azote) :

Sur une série de 26 carottes, une carotte a été marquée au ¹⁵NH₄⁺ de manière à atteindre un enrichissement de 10%. Immédiatement après la fin de l'incubation (0, 6 h) et l'homogénéisation du sédiment avec l'eau interstitielle, 3 ml du mélange a été transféré dans un flacon Duran-Schott de 50 mL. L'ammonium a été extrait de l'échantillon par diffusion à 60°C dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la RDNA (Brooks et al. 1989). Le taux de minéralisation a été mesuré par spectrométrie de masse (spectromètre de masse Integra CN, SERCON) à partir du taux de dilution isotopique de ¹⁵NH₄⁺ contenu dans le ¹⁴NH₄⁺.

5. Réalisation des microcosmes :

5.1 Description des microcosmes :

Les microcosmes sont des cylindres de 10 cm de diamètre et 25 cm de hauteur, avec un volume total d'environ 2 L (Fig. II.2). Les microcosmes ont été remplis avec du sédiment non perturbé provenant des campagnes d'échantillonnage comme décrit dans le paragraphe 2 et ont été incubés à température ambiante. Chaque microcosme présente un périphérique d'entrée d'eau (0,3 cm de diamètre intérieur) situé à 1 cm au-dessus de la surface des sédiments. Au cours de l'incubation, la colonne d'eau dans les microcosmes a été délicatement mélangée à l'aide d'un agitateur magnétique suspendu. Le périphérique de sortie était situé du côté opposé à 1 cm au-dessus de la surface des sédiments. L'eau parvient aux microcosmes grâce à une pompe péristaltique à partir de réservoirs de 5 L, avec un débit de 0.09 L.h^{-1} (le temps de séjour dans chaque microcosme est d'environ 10,5 heures). Les microcosmes étaient hermétiques afin de pouvoir analyser les gaz produits et les réservoirs étaient ouverts afin de prévenir l'accumulation de N_2 . L'expérience a été menée de manière indépendante pour chaque station.

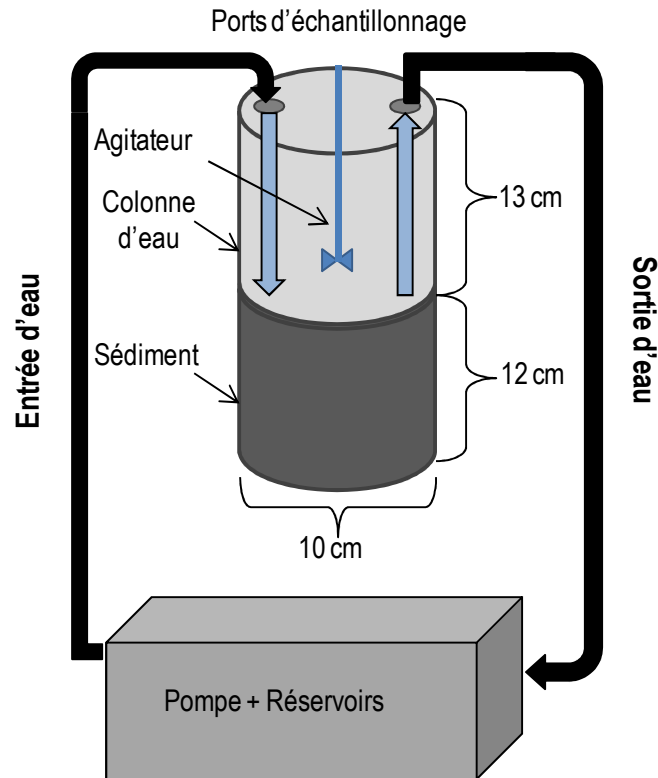


Fig. II. 2 Schéma d'un montage d'un microcosme, chaque microcosme étant connecté à une pompe péristaltique et un réservoir d'eau de mer synthétique à la salinité requise.

5.2 Simulations des fluctuations de la salinité dans les microcosmes :

Avant le début de l'expérimentation, les microcosmes ont été stabilisés à la salinité *in situ* pendant 72h qui a été défini comme le temps adéquat pour atteindre des taux de consommation constants en N-NO_3^- et N-NH_4^+ dans les microcosmes.

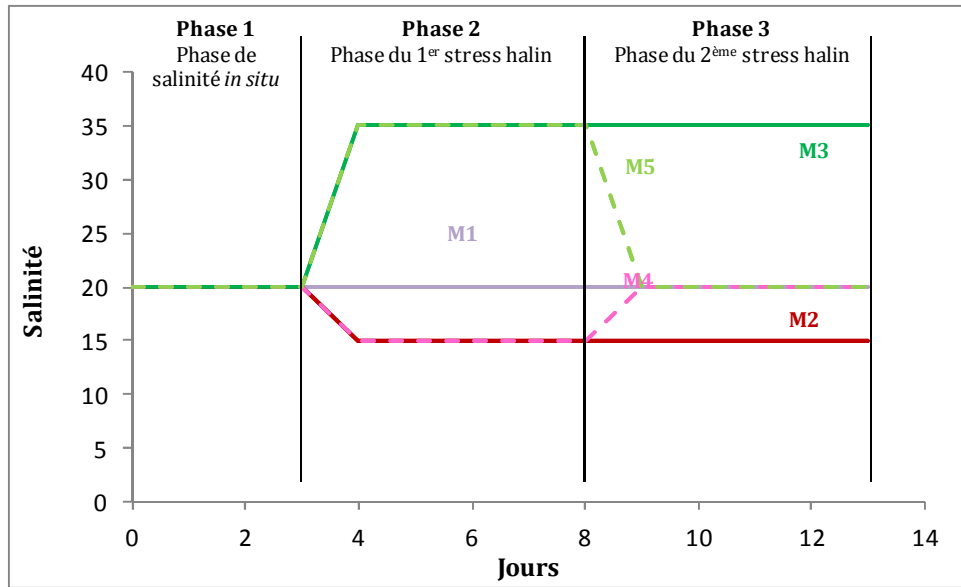
Pour chaque station d'échantillonnage, une série de cinq microcosmes contenant des sédiments de la même station et ayant subi le même traitement initial ont été soumis à différents scénarios de fluctuations de salinité (Fig. II.3). Pendant la première phase de l'expérimentation (phase de salinité *in situ*) qui n'excédait pas 3 jours, 5 répliques indépendants de microcosmes ont été maintenus à la salinité *in situ* afin de stabiliser le

système (20 pour la S1 et 35 pour la S3), le microcosme (M1) a servi de contrôle et a été maintenu à la salinité *in situ* tout au long de l'expérience. Durant la phase 2 (phase du 1^{er} stress halin), 4 des 5 microcosmes ont subi une première perturbation : les microcosmes M2 et M4 ont été soumis à une diminution de salinité, correspondant pour la S1 à la salinité minimale enregistrée dans l'étang (S=15) et pour la S3 à une salinité intermédiaire (S=25), les microcosmes M3 et M5 ont été soumis à des salinités correspondantes aux valeurs extrêmes enregistrées au cours des 20 dernières années dans l'étang, soit 35 pour la S1 et 15 pour la S3. Au cours de la troisième phase (phase du 2^{ème} stress halin), quelle que soit la série, les microcosmes M4 et M5 ont été ramenés à la salinité *in situ* tandis que les microcosmes M2 et M3 ont été maintenus à la salinité appliquée en phase 2.

Pour chaque microcosme, 3 mL d'eau interstitielle ont été prélevés 2 fois par jour puis directement stockés au froid (-20°C) pour le dosage des composés azotés et la quantification des activités de nitrification et de RDNA.

Deux millilitres d'eau interstitielle ont également été prélevés 2 fois par jour dans des tubes en verre (Venoject®, Terumo) pour la mesure des cinétiques de $^{28}\text{N}_2$, $^{29}\text{N}_2$ et $^{30}\text{N}_2$ au spectromètre de masse. A la fin de l'expérimentation, 4 échantillons de sédiments ont été prélevés dans chaque microcosme et conservés à -80 °C. Des échantillons du sédiment initial de chaque station ont également été conservés en duplicata à -80 °C pour des analyses en biologie moléculaire.

(a)



(b)

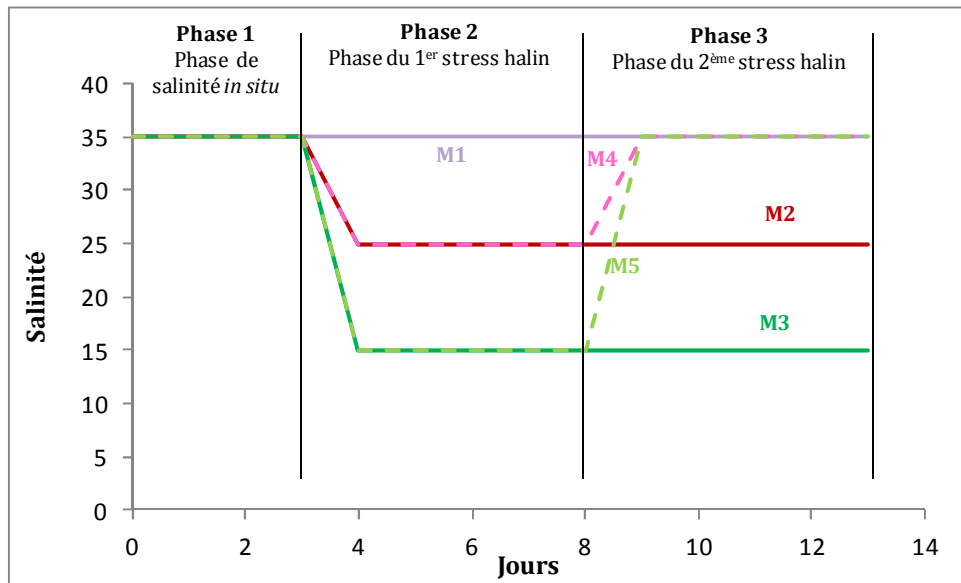


Fig. II. 3 Diagrammes des scénarios de fluctuations de salinité dans les sédiments de la station SA1 (a) et de la station SA3 (b).

6. Approche moléculaire et diversité microbienne :

6.1 Techniques de biologie moléculaire :

6.1.1 Extraction des acides nucléiques :

6.1.1.1 *Extraction d'ADN à partir des échantillons de sédiments :*

L'extraction d'ADN à partir de 0.25 g ou 0.5 g de sédiment est réalisée en suivant le protocole de purification des ADN du sol (PowerSoil DNA kit, MO BIO®, Laboratories Inc.). Notre choix s'est porté pour cette technique du fait de son efficacité d'élimination des substances humiques inhibitrices de la réaction de PCR. Ce kit permet d'améliorer cette élimination grâce à une technique IRT (Inhibitor Removal Technology®). Par ailleurs, il combine une lyse chimique et une lyse mécanique des cellules au moyen de billes de verre qui augmentent le rendement d'extraction. Après extraction, l'ADN est purifié sur une colonne de silice, puis élué dans de l'eau ultra pure et conservé à -20°C. Les ADN extraits peuvent être quantifiés en mesurant leur densité optique (DO) à 260 nm par spectrométrie. Une $DO_{260} = 1$ correspond à une concentration de 50 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ d'ADN double brin.

6.1.1.2 *Extraction d'ARN à partir des échantillons de sédiments :*

L'extraction des ARN à partir de 2 g de sédiment est réalisée suivant le protocole de purification de l'ARN total du sol (RNA Power Soil, MO BIO®, Laboratories, Inc.). Ce kit permet l'élimination des substances susceptibles d'inhiber les RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR) et la PCR, y compris les substances humiques grâce à la technique IRT®. Comme pour l'ADN, ce kit combine une lyse chimique et une lyse mécanique des cellules au moyen de billes qui augmentent le rendement de l'extraction. A la fin de l'extraction l'ARN total est retenu sur une colonne matrice, lavé et élué. Il est ensuite

conservée à -80°C. Sa concentration est mesurée par spectrométrie à 260 nm (DO=1 correspond à 30µg. mL⁻¹).

6.1.2 Détection et quantification d'acides nucléiques par PCR :

Dans cette étude, les gènes codant pour l'ARN ribosomal 16S et ceux codant pour l'ammonium mono-oxygénase ainsi que leurs transcrits ont été étudiés par PCR.

Les différentes amorces (oligonucléotides) utilisées au cours de cette étude sont présentées dans le tableau (II.3).

Pour chaque échantillon, les conditions d'amplification des fragments d'ADNr 16S et des gènes *amoA* codant pour l'ammonium mono-oxygénase (responsable de la première étape de la nitrification) ont été développées pour les *Bacteria* et *Archaea*. La quantité d'ADN cible, la concentration des amorces et les spécificités techniques de différentes polymérases ont été optimisées par Axel Aigle au cours de son stage de Master 2.

Tableau II. 3 Récapitulatifs des amorces et des programmes PCR utilisés lors de cette étude.

a) Programmes PCR classiques

Gène cible	Amorce	Sens	Séquence de l'amorce (de 5' vers 3')	Dénaturation initiale	Dénaturation	Hybridation	Elongation	Cycles	Elongation finale	Références
ARNr 16S Bacteria	GML5F (clamp) ou DGGE300F	Sens	CCGCCTACGGGAGGCAGCAG	95°C pendant 5 minutes	95°C pendant 30 secondes	55°C pendant 30 secondes	72°C pendant 40 secondes	30	72°C pendant 2 minutes	Muyzer et al. 1993
	907Mr	Anti-sens	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT							
ARNr 16S Archaea	Archclamp344gc-F	Sens	ACGGGGYGCAGCAGGCGCGA	95°C pendant 5 minutes	95°C pendant 30 secondes	61°C pendant 30 secondes	72°C pendant 30 secondes	35	72°C pendant 10 minutes	Casamayor et al. 2002
	Arch915R	Anti-sens	GTGCTCCCCGCGCAATTCCT							
<i>amoA</i> Bacteria	<i>amoA</i> -B1F	Sens	GGGGHTTYTACTGGTGGT	95°C pendant 5 minutes	95°C pendant 30 secondes	55°C pendant 30 secondes	72°C pendant 45 secondes	35	72°C pendant 10 minutes	Rotthauwe et al. 1997
	<i>amoA</i> -B2R	Anti-sens	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC							
<i>amoA</i> Archaea	<i>CrenamoA</i> 23F	Sens	ATGGTCTGGCTWAGACG	94°C pendant 5 minutes	94°C pendant 45 secondes	94°C pendant 1 minute	72°C pendant 1 minute	40	72°C pendant 3 minutes	Tourna et al. 2008
	<i>CrenamoA</i> 616r	Anti-sens	GCCATCCATCTGTATGTCCA							

b) Programmes qPCR

Gène cible	Amorce	Sens	Séquence de l'amorce (de 5' vers 3')	Dénaturation initiale	Dénaturation	Hybridation	Elongation	Cycles	Melting curve	Références
ARNr 16S <i>Bacteria</i>	DGGE300F	Sens	CCGCCTACGGGAGGCAGCAG	95°C pendant 10 minutes	95°C pendant 10 secondes	55°C pendant 10 secondes	72°C pendant 12 secondes	45	65°C à 95°C 0.5°C/5s	Muyzer et al. 1993
	Univ516R	Anti-sens	GTDDTTACCGCGGCKGCTGRCA							Takai and Horikoshi, 2000
ARNr 16S <i>Archaea</i>	931F	Sens	AGGAATTGGCGGGGAGCA	95°C pendant 10 minutes	95°C pendant 10 secondes	62°C pendant 10 secondes	72°C pendant 14 secondes	35	65°C à 95°C 0.5°C/5s	Jackson et al. 2001
	m1100r	Anti-sens	BTGGGTCTCGCTCGTTRCC							Einen et al. 2008
<i>amoA</i> <i>Bacteria</i>	<i>amoA</i> -B1F	Sens	GGGGHTTYTACTGGTGGT	98°C pendant 2 minutes	98°C pendant 5 secondes	58°C pendant 30 secondes	72°C pendant 1 minute	40	65°C à 95°C 0.5°C/5s	Rotthauwe et al. 1997
	<i>amoA</i> -B2R	Anti-sens	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC							
<i>amoA</i> <i>Archaea</i>	Arc- <i>amoA</i> -modF	Sens	CWGAYTGGRYDTGGACHTC	98°C pendant 2 minutes	98°C pendant 5 secondes	62°C pendant 30 secondes		35	65°C à 95°C 0.5°C/5s	Modifiés d'après Wuchter et al. 2006
	Arc- <i>amoA</i> -modR	Anti-sens	TTYKYTYGTDCCAGTA							

(Dégénérescences sens : Y = C/T, W = A/T, R = A/G, D = A/G/T, H = A/C/T. Dégénérescences anti-sens : M = G/T, R = C/T, K = A/C, S = C/G, D = A/C/T, Y = A/G.)

6.1.3 PCR des gènes codant pour l'ARNr 16S *Archaea* et *Bacteria* :

(a) PCR classique

Les amplifications optimales par PCR ciblant les gènes codant pour l'ARNr 16S ont été obtenues à partir de 0.9 et 2 ng d'ADN par tube PCR, pour les *Archaea* et les *Bacteria*, respectivement. Le mélange réactionnel (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 8,3) est réalisé dans un volume final de 20 µL et contient 0,1 mM de désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP), 1 µL de solution Q, 0,31 µM (*Archaea*) à 1,25 µM (*Bacteria*) de chacune des amorces (respectivement Arch344gc-F_Arch-915-R et DGGE300F_907Mr) et une unité de HotStarTaq® polymérase (Qiagen). Après une phase de dénaturation initiale de 5 minutes à 95°C, l'ADN subit une série de cycles (35 pour *Archaea* et 30 pour *Bacteria*) composés d'une phase de dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, d'une phase d'hybridation de 30 secondes (61°C et 55°C pour *Archaea* et *Bacteria*, respectivement), d'une phase d'élongation à 72°C (30 et 40 secondes pour *Archaea* et *Bacteria*, respectivement). S'ensuit une élongation finale de 10 minutes pour les *Archaea* et de 2 minutes pour les *Bacteria*.

(b) PCR-DGGE

Les produits de PCR utilisés pour la détection des fragments en électrophorèse DGGE nécessitent fréquemment l'ajout sur l'un des deux primers d'une séquence de 40 bases additionnelles en 5' (clamp - 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G-3'). Ceci permet d'améliorer la détection des variations génétiques des fragments d'ADN amplifiés. Dans ces conditions et pour essayer d'amplifier le maximum de membre de la communauté, les primer et le cycle de PCR sont modifiés. Les amorces sont respectivement ArchClamp344gc -F_Arch-915-R et Clamp-GML5F_907Mr) et une unité de HotStarTaq® polymérase (Qiagen). L'ADN matrice est initialement dénaturé (5 minutes à 95°C) puis subit une étape de dénaturation pendant plusieurs cycles (1

minute à 94°C), une étape d'hybridation des amorces et une étape d'élongation (1 minute à 72°C). L'hybridation des amorces se fait selon un protocole « touchdown » (Muyzer et al, 1993). Lors des premiers cycles, la température d'hybridation est élevée de 10°C par rapport à la température d'hybridation classique ce qui assure une forte stringence et donc une amplification spécifique. Ainsi, le fragment d'intérêt devient majoritaire vis-à-vis des autres séquences. Par la suite, la température d'hybridation diminue de 1 °C tous les 2 cycles pendant 20 cycles. Cette plage de température (T+10 à T °C) permet d'obtenir la température optimale d'hybridation. La PCR se poursuit avec 14 cycles à température optimale d'hybridation et s'achève par une élongation finale de 10 min à 72 °C.

6.1.4 Amplification des gènes *amoA* *Archaea* et *Bacteria* :

(a) PCR classique

Le gène *amoA* code pour l'ammonium mono-oxygénase qui est une enzyme intervenant dans la 1ère étape de la nitrification (Oxydation de l'ammonium en nitrite). L'amplification optimale du gène *amoA* est obtenue à partir des extraits d'ADN non dilués, soit 20 à 80 ng d'ADN par tube PCR. Le mélange réactionnel (Mastermix Taq-&LOAD™ 5xC, MP Biomedicals®) contient tous les constituants PCR (tampon PCR 5X, dNTPs, Taq Polymérase, MgCl₂ à 1,5 mM), seul 1,25 µM de chaque amorce (*CrenamoA* 23f-*CrenamoA* 616r (*Archaea*), *amoA*-B1F-*amoA*-B2R (*Bacteria*), tableau II.3), de l'eau ultra pure et l'échantillon sont ajoutés. La PCR *amoA Bacteria* a été réalisée selon le programme suivant : 5 min de dénaturation initiale à 95°C suivie de 35 cycles composés d'une phase de dénaturation (30 s à 95°C), d'une phase d'hybridation des amorces (30 s à 55°C) et d'une phase d'élongation (45 s à 72°C), et terminée par une élongation finale de 10 min à 72°C.

L'amplification du gène *amoA* a été réalisée selon le programme suivant 5 min de dénaturation initiale à 95°C suivie de 40 cycles composés d'une phase de dénaturation (45 s à 95°C), d'une phase d'hybridation des amorces (1 min à 55°C) et d'une phase d'élongation (1 min à 72°C), et terminée par une élongation finale de 3 min à 72°C.

(b) PCR DGGE des gènes amoA

Pour l'électrophorèse DGGE, il n'est pas nécessaire de rajouter un clamp au fragment du gène *amo*. Des échantillons déposés sur gel DGGE ont donc été amplifiés par PCR classique.

6.1.5 La PCR quantitative (q-PCR) :

(a) Principe de la q-PCR :

Les gènes d'intérêt présents dans un échantillon sont quantifiés par qPCR. Le suivi de l'amplification de la séquence cible en temps réel est obtenu par l'ajout d'un agent intercalant de l'ADN (SYBR® green) qui fluoresce lorsqu'il est fixé à de l'ADN double brin. L'émission des fluorescences, mesurée au cours de la phase d'élongation, est proportionnelle à la quantité d'amplicons produits.

L'amplification par qPCR d'un gène est composée de trois phases : une phase de bruit de fond (où le nombre de brins néoformés est inférieur au seuil de détection appelé fluorescence seuil : Ct), une phase exponentielle et une phase plateau (due à l'inactivation de la Taq et à l'épuisement des produits PCR) (Fig. II.4).

La quantification est réalisée pendant la phase exponentielle suivant la formule:

$$N = N_0 \times E^k$$

Avec N : nombre final d'exemplaires du gène, proportionnel à la fluorescence du SYBR® green

N_0 : nombre initial d'exemplaires du gène,

E : efficacité de la réaction, calculée grâce à la construction d'une droite d'étalonnage selon la formule suivante $E = 10^{-1/S}$ (avec S : pente de la droite d'étalonnage)

k : nombre de cycle d'amplification pour atteindre une fluorescence seuil, Ct.

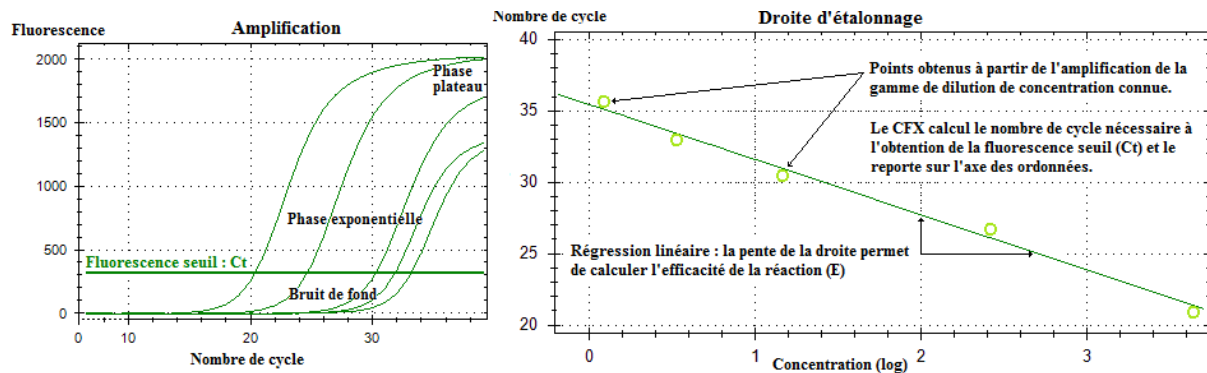


Fig. II. 4 Résultats d'une PCR quantitative et exemple d'une droite d'étalonnage.

Pour la quantification des gènes de l'ARNr 16S (*Bacteria* et *Archaea*) et du gène *amoA* *Bacteria*, les gammes d'étalonnage sont réalisées à partir de clones de collection déjà disponibles au laboratoire. Dans le cas de la quantification du gène *amoA* *Archaea*, la gamme étalon a été réalisée à partir d'un clone environnemental isolé au laboratoire (par Sophie Guasco et Axel Aigle).

Dans le cas de la quantification des gènes codant pour l'ARNr 16S des *Bacteria* et des *Archaea*, les amplifications ont été réalisées avec un LightCycler™ (Roche Diagnostics®). Le mélange réactionnel contient 2 µL de LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I 10X (Roche Diagnostics®), 2 mM de MgCl₂, 0,25 µM de chaque amorce (DGGE300F- Univ 516 (*Bacteria*) et 931F- m1100r (*Archaea*), tableau II.3) et 0,9 et 2 ng d'ADN par tube PCR, respectivement pour les *Archaea* et les *Bacteria*, pour un volume final de 20 µL. L'amplification PCR est réalisée selon le programme suivant : 10 min de dénaturation initiale à 95 °C suivies de 45 cycles composés d'une phase de dénaturation (10 secondes à 95 °C), d'une phase d'hybridation des amorces (10 secondes à 55 °C),

d'une phase d'élongation (12 secondes à 72 °C) et terminée par la courbe de fusion (65 °C à 95 °C avec 0.5 °C. 5 s⁻¹).

Les quantifications du gène *amoA* (*Bacteria* et *Archaea*) ont été réalisées dans un CFX96 Real Time System (C1000 thermal cycler®, Bio-Rad Laboratories) à l'aide du logiciel Bio-Rad CFX Manager 2.1®. La quantification des gènes *amoA* des archées utilise les amorces *arc-amoA-mod F* et *arc-amoA-mod R* et celle des bactéries utilise les amorces *amoA-1F* et *amoA-2R* et le mix de PCR Sso Advanced™ SybrGreen Supermix.

(b) Préparation de la gamme étalon amoA Archaea :

Après amplification par PCR du gène *amoA Archaea*, les produits amplifiés sont déposés sur gel d'agarose 1 % et purifiés à l'aide du kit d'extraction de l'ADN à partir des gels d'agarose (MinElute® Gel Extraction kit, Qiagen). Le fragment est ensuite introduit dans un plasmide par ligation qui est réalisé dans un volume final de 10 µL et contient 5 µL de tampon de ligation (2X), 1 µL de vecteur (pGEM®-T easy vector à 50 ng.µL⁻¹), 3 µL de produit PCR purifié et 3 unités d'ADN ligase T4. Le tout est incubé pendant une nuit à 4 °C.

La transformation est réalisée par choc thermique avec 3 µL du produit de ligation et 50 µL de cellules *Escherichia coli* souche JM109 (Z-Competent™). Les cellules ainsi transformées sont mélangées dans 950 µL de milieu SOC (2 % tryptone, 0,5 % yeast extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose) et incubées à 37 °C pendant 1h30. Les cellules sont, ensuite, étalées sur boîte LB-agar (levure, tryptone, NaCl et citrate de fer) contenant 10 mg.mL⁻¹ d'ampicilline et préalablement recouverte d'IPTG (100 mM) et de S-gal (50 mg.mL⁻¹) permettant une sélection blanc/noir. Après incubation à 37 °C à l'étuve pendant une nuit, les colonies transformées contenant la séquence d'intérêt (blanches) sont repiquées sur boîte

d'isolement (LB-agar + ampicilline 10 mg.mL⁻¹). Les clones positifs sont mis en culture en milieu liquide (LB + ampicilline 10 mg.mL⁻¹) toute la nuit à 37 °C sous agitation (170 rpm) et les plasmides sont extraits de la cellule (Plasmid Mini kit, Qiagen®). Ils sont ensuite quantifiés et envoyés à séquencer (GATC Biotech®, Allemagne) puis seront utilisés pour réaliser la courbe d'étalonnage. L'amorce sélectionnée pour la réaction de séquençage est M13 forward (5'-TGTAACGACGGCAGT-3').

6.1.6 Reverse Transcriptase (RT-PCR) :

La RT-PCR a été mise au point afin de pouvoir détecter et amplifier les ARN par PCR. Une fois extraits, les ARN sont incubés en présence de transcriptase reverse qui va générer une copie d'ADN complémentaire (ou ADNc) de chaque ARN. A l'issue de l'étape de reverse transcription, les ARN sont hydrolysés (dans notre cas avec de la RNase). Les ADNc monocaténares sont ensuite répliqués et amplifiés par l'ADN polymérase. Les ADNc pourront alors être quantifiés par qPCR.

6.1.7 Electrophorèse sur gel d'agarose :

La taille des produits d'amplification est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (Promega®) préparé à partir d'un tampon TBE 1X (Tris-Borate-EDTA, pH 8,3) auquel on ajoute du GelRed (0,5 µg.mL⁻¹) pour colorer les acides nucléiques. Dans le cas où le tampon de charge n'est pas contenu dans le mix de PCR, les produits avant dépôt sont complétés avec 3 µL de bleu de dépôt TAE 1X ((Tris-acétate-EDTA, pH 8,3), glycérol, bleu de Bromophénol). 5 µL d'un marqueur de taille (Marker XIV, 2 µL + 2 µL de bleu de dépôt) sont également déposés sur gel d'agarose. La migration s'effectue à 90 V pendant 45 min dans du tampon TBE 1X. La visualisation des acides nucléiques est réalisée sous lumière UV.

6.2 Etude de diversité:

6.2.1 Empreinte génétique par DGGE:

La DGGE est une technique de séparation électrophorétique basée sur la différence de comportement de fragments d'ADN double brin au cours de leur dénaturation (Fisher & Lerman 1979). Les produits de PCR sont déposés et séparés sur un gel vertical de polyacrylamide (la concentration en acrylamide est de 6%) présentant un gradient dénaturant d'urée et de formamide (30-50% pour les gènes de l'ARNr 16S et 20-50% pour les gènes *amoA*) 100% de dénaturation correspondant à 7M Urée et 40% (V/V). Le système utilisé est un Dcode (BioRad Laboratories®). La quantité de produits PCR déposée dans chaque puits a été fixée entre 200 ng (pour le gène *amoA*) et 300 ng (pour le gène de l'ARNr 16S). Le standard de mobilité utilisé (10 µL à 15 µL) est un mélange de produits PCR (30 ng d'ADN de chaque produit PCR) issus de l'amplification du gène codant pour l'ARNr16S du chloroplaste d'*Emiliana huxleyi*, de souches procaryotiques de collection et de clones : *Clostridium perfringens*, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, la souche SR283 (*Proteobacteria* du genre *Stappia*), *Micrococcus luteus* et deux clones de *Crenarchaeota thermophiles* : 9S25 (le plus proche représentant cultivé étant *Ignicoccus hospitalis*) et 9S28 (une *Crenarchaeota* thermophile proche de *Candidatus nitrosocaldus yellowstonii*).

La migration s'effectue à 150 V pendant 280 minutes dans 7 litres de tampon d'électrophorèse TAE (1x) (Tris-HCl 40 mM à pH 8.3, acide acétique 20 mM, EDTA 1mM). La température du tampon d'électrophorèse est maintenue à 60°C tout au long de la migration. Le gel est ensuite incubé 30 minutes dans 400 ml de tampon TAE 1x contenant 20 µL de bromure d'éthidium (BET) à 10 mg. mL⁻¹ et photographié sous lumière ultra violette (GelDoc 2000®, gel documentation system, BioRad). Les images

des gels DGGE sont numérisées à l'aide du logiciel Quantity One (BioRad Laboratories®) et analysées à l'aide du logiciel Gel Compar II 5.1. Ce logiciel permet de séparer les images numériques des gels par piste. A chaque dépôt (piste) correspond un profil de migration mesuré en intensité de pixels. L'intensité du bruit de fond est soustraite de chaque profil en utilisant le principe du « *rolling ball* » (Sternberg 1983) d'une valeur optimale pour nos gels de 14%.

Les courbes densitométriques du profil de chaque piste sont extraites afin de normaliser tous les profils du gel. Cette normalisation permet de faire des comparaisons inter-gel basées sur la calibration des standards de chaque gel entre eux. Les différentes bandes sur chaque profil ont été identifiées automatiquement par le logiciel puis vérifiées manuellement. Une correspondance entre les bandes est alors effectuée par le logiciel.

Les similarités deux à deux des pistes des profils DGGE sont calculées selon deux méthodes.

La première vise à analyser les profils présents d'un point de vue qualitatif. Dans ce cas, on ne tient pas compte de l'intensité de fluorescence de chaque bande, mais uniquement de sa présence (1)/absence (0) sur le profil de migration. Le coefficient de similarité de Jaccard (S_j) a été choisi pour traiter ces données. Cet indice varie de 0 (aucune bande commune) à 1 (profils identiques). La matrice de similarité entre toutes les paires de bandes ainsi obtenue est traitée avec un algorithme d'agrégation par lien moyen (UPGMA, Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean. Sneath et Sokal, 1973) afin d'obtenir une classification ascendante hiérarchique visualisable sous forme de dendrogramme.

La deuxième méthode consiste à donner plus de poids aux génotypes majoritaires. Dans ce cas, l'intensité des pixels (et donc des bandes) est prise en compte. Cette intensité est ensuite normalisée en pourcentage par le logiciel GelCompar II 5.1® (Applied Maths,

Belgique). Les coefficients de corrélation de Pearson de chaque piste, comparée deux à deux, sont ensuite calculés. Comme pour la première méthode, la matrice de similarité entre toutes les paires de bandes ainsi obtenue est traitée avec l'algorithme d'agrégation par lien moyen (UPGMA) afin d'obtenir une classification ascendante hiérarchique visualisable sous forme de dendrogramme.

6.2.2 Analyse de séquence :

Les bandes de gel sont excisées puis placées dans 50 μ L d'eau ultra pure pendant une nuit à 4°C. L'ADN contenu dans les mailles du gel diffuse dans l'eau et est utilisé comme matrice pour la réamplification. Les mélanges réactionnels et les programmes utilisés sont identiques à ceux de la PCR-DGGE. La pureté et la taille des produits de réamplification sont vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Les bandes correspondant aux fragments d'ADN attendus sont excisées et purifiées des enzymes, des amorces et du tampon en suivant le protocole du kit « MinElute® PCR Purification » (Qiagen). Les produits purifiés sont rigoureusement quantifiés à l'aide d'un spectrophotomètre (NanoDrop®). Leurs volumes sont ensuite ajustés et envoyés pour séquençage à la société GATC. Les séquences obtenues sont comparées à celles disponibles dans la base de données NCBI avec le programme BLASTn. L'alignement des différentes séquences est réalisé par alignement global multiple grâce au logiciel ClustalW (Thompson et al. 1994). Les arbres phylogénétiques sont construits selon la méthode du plus proche voisin (Neighbor Joining Method. (Saitou & Nei 1987)), à l'aide du logiciel MEGA 5.05, et leur robustesse est testée par bootstrap (obtenus sur 500 répliques).

6.3 Analyse de données :

Les variations spatiales et temporelles dans les processus d'azote ont été élucidées grâce à des analyses hiérarchiques de la variance (ANOVA).

Une analyse statistique des relations entre les observations a été faite à l'aide de corrélation de Pearson et réalisée en utilisant le progiciel XLSTAT® (XLSTAT software® 2008, Addinsoft, Paris).

Les différences entre les activités du cycle de l'azote dans les microcosmes ont été testées par des tests Student (*test t*). Ces tests ont également permis de comparer les valeurs de la quantification des gènes d'ARNr 16S et *amoA*.

Le suivi des activités du cycle de l'azote dans les microcosmes a été représenté sous forme de boîtes à moustaches (Box Plots), à l'aide du logiciel XLSTAT® (XLSTAT software® 2008, Addinsoft, Paris). Les boîtes à moustaches ont également été utilisées pour élucider le suivi dans le temps des valeurs de salinité et des concentrations en nitrate dans les stations SA1 et SA3 depuis 1994.

Des box plot ou boîtes à moustaches ont été utilisées à 2 reprises dans ce travail de thèse : dans le 3^{ème} chapitre pour représenter l'évolution des valeurs de salinité, du nitrate et de l'ammonium au fond de la colonne d'eau de nos 2 stations d'échantillonnage, et dans le 4^{ème} chapitre pour représenter les flux d'azote issus des microcosmes dans ces mêmes stations.

Dans un box plot, la ligne centrale indique la médiane, la croix marque la valeur moyenne. Les bords du box plot représentent le 1^{er} et le 3^{ème} quartile, les lignes verticales indiquent la gamme de valeur qui est 1.5 fois la moyenne de chaque quartile.

Une Analyse en Composantes Principales (ACP) et une Analyse Canonique des Correspondances (ACC) ont été utilisées afin d'établir les corrélations éventuelles entre nos différentes données (paramètres environnementaux, activités du cycle de l'azote,

composition de la communauté microbienne, etc.) à l'aide du logiciel XLSTAT® (XLSTAT software® 2008, Addinsoft, Paris).

Chapitre III
**Trends in salinity and inorganic
nitrogen compounds in the Berre
lagoon (1994 – 2011): Bacterial
activities and nitrogen budgets**

Chapitre III: Trends in salinity and inorganic nitrogen compounds in the Berre Lagoon (1994–2011): Bacterial activities and nitrogen budgets

***Publié dans Marine Pollution Bulletin
doi 10.1016/j.marpolbul.2012.11.046***

Imen Zaghmouri¹, Valerie D. Michotey¹, Sophie Guasco¹, Patrick Raimbault¹,
Nicole Garcia¹, Guillaume Bernard² and Patricia C. Bonin^{1,*}

1- Aix-Marseille Université, Université du Sud Toulon-Var, CNRS/INSU, IRD, MIO, UM 110, 13288, Marseille, Cedex 09.

2- GIPREB Syndicat Mixte, Cours Mirabeau. 13130 Berre-l'Etang France

Address for correspondence: Bonin P. Mediterranean Institute of Oceanography (MIO) Aix Marseille Université Campus de Luminy, Case 901, 13288 Marseille cedex 9. France.

* Email: patricia.bonin@univ-amu.fr

Tel: +33 491829336

Fax: +33 491829641

Avant propos

Depuis les années 1970, d'importantes recherches ont été portées sur la capacité des sédiments estuariens et lagunaires à atténuer les charges d'azote avant d'atteindre les mers côtières (Nielsen & Glud 1996, Nedwell et al. 1999, Dong et al. 2000). Dès quelques millimètres en dessous de la surface, les sédiments lagunaires sont essentiellement anaérobies. La minéralisation de la matière organique utilise alors le NO_3^- et le SO_4^{2-} comme accepteurs terminaux d'électron. Le NO_3^- va aussi être, soit réduit sous forme de N_2 gazeux par les processus de dénitrification et d'anammox et donc éliminé de l'écosystème, soit sous forme de NH_4^+ par le processus de la RDNA qui va maintenir l'azote dans l'écosystème, biodisponible pour la chaîne trophique (Trimmer et al. 2003). Il a été montré que des changements dans les apports en matière organique et des concentrations en NO_3^- pourraient affecter la répartition des 2 produits finaux de la réduction du NO_3^- (Bonin 1996, Trimmer et al. 2003).

Cette étude s'intègre dans le cadre de la réhabilitation de l'étang de Berre en collaboration avec le GIPREB, ayant pour but la compréhension de la dynamique biogéochimique des sédiments de l'étang en fonction des apports en eau douce et en sels nutritifs.

L'évolution des valeurs de salinité et des teneurs en nitrate depuis 1994 dans nos 2 stations d'échantillonnage a été établie à partir des données fournies par le GIPREB.

Un suivi de l'activité des processus essentiels associés au cycle de l'azote dans le sédiment a été réalisé à partir de 6 campagnes d'échantillonnage réparties sur l'année (Avril 2010, Juillet 2010, Septembre 2010, Novembre 2010, Février 2011 et Avril 2011) dans des zones ayant des schémas de fluctuations de salinité très contrastés. Les

différents processus du cycle de l'azote (nitrate réduction, nitrification, dénitrification, anammox, RDNA) sont mesurés par la méthode d'isotope pairing modifiée par Minjeaud et al. (2008) et permettant la mesure simultanée de la dénitrification et de l'anammox.

La quantification des processus de régénération dans le sédiment (ammonification, nitrification) et ceux obtenus dans la colonne d'eau par Gouze et al. (Gouze et al. 2008b), ont permis d'expliquer en partie l'importante production primaire enregistrée dans l'étang.

Les résultats de cette étude ont révélé que la majorité du nitrate dénitrifié provient du processus de nitrification et que la dénitrification est le processus majeur d'élimination du N_2 du milieu. Nous avons également montré que les processus de régénération dans le sédiment et la colonne d'eau soutiennent en partie la demande pélagique en NH_4^+ et en NO_3^- et que la forte production primaire enregistrée à l'étang de Berre peut être expliquée par d'autres sources d'azote qui pourraient contribuer à cette forte production primaire.

Le travail présenté dans ce chapitre a permis de mettre en évidence la contribution du sédiment dans l'élimination de l'azote par les processus de dénitrification et d'anammox qui libèrent du N_2 gazeux et aussi son rôle dans le stockage et la régénération des différentes formes d'azote afin de répondre à la forte demande pélagique dans l'étang et a fait l'objet d'une publication dans Marine Pollution Bulletin.

1. Abstract

The Berre lagoon receives freshwater from two natural rivers but the implementation of the hydroelectric power plant led to strong changes in the ecosystem structure and functioning. Sediments are important sites for nitrogen cycling because the O_2 sharp gradient allows oxic nitrification as well as anoxic denitrification and anammox to operate in close proximity. Seasonal and short-term variations in the coastal nitrogen processes were quantified at two stations: SA1 located in the northern part of the lagoon directly under the inflows of freshwater and SA3 in the southern part of the lagoon influenced mainly by the marine water inflows. Results revealed that most of the nitrate formed by nitrification was denitrified. Total denitrification was the main N_2 removal process. The high primary production based on $N-NH_4^+$ might be explained by mineralization rates, while the primary production based on $N-NO_3^-$ was not fully explained by nitrification.

Keywords: *sediment, nitrification, denitrification, anammox, coupled nitrification/denitrification, Berre lagoon*

Highlights:

- The Berre lagoon eutrophication through nutrient and freshwater inputs was assessed.
- Salinity variations showed no direct effect on the nitrogen activities.
- Denitrification is the main process for N_2 removal.
- Regenerated nitrogen from sediments doesn't fully explain the high primary production.

2. Introduction

Coastal lagoons are productive ecosystems, but they are often under strong natural and anthropogenic pressures. They receive freshwater inputs, rich in organic and mineral nutrients particularly nitrogen (N) and phosphorus (P) drained from heavily exploited catchment basins and by surrounding urban and industrial activities (Valiela et al. 1997, Bowen et al. 2011). In these water bodies, nutrient inputs often cause undesirable water quality changes (Smith et al. 2006), which in turn, stimulate eutrophication processes (Cloern 2001). The combining effect of a high N and P exchange between the sediment and the water column and a low water turnover results in instability leading to the development of fast growing phytoplankton (Rysgaard et al. 1996). In coastal waters, eutrophication induces major ecological problems such as oxygen depletion or hypoxia (especially at the bottom of the water column) (Rysgaard et al. 1996, Minjeaud et al. 2008), massive phytoplankton blooms, shifts in relative abundance of organisms and a loss in biodiversity (Lane et al. 2007).

Inorganic nitrogen compounds can be introduced to coastal waters as nitrate (NO_3^-), nitrite (NO_2^-) and ammonium (NH_4^+) via tributaries, atmospheric deposition, groundwater inputs or through biological N-fixation (Paerl et al. 2002, Seitzinger et al. 2002, Gardner et al. 2006). Processes that affect the availability of inorganic nitrogen are important regulators of the ecosystem functioning and of the global N-biochemistry (Codispoti & Christensen 1985, Thamdrup & Dalsgaard 2002). Therefore, an improved understanding of the nitrogen transformations and of its fate in the water column and in the sediments is needed to assess the water quality and health of aquatic ecosystems (Galloway et al. 2003, Horner-Devine & Martiny 2008, Mulholland et al. 2008, Seitzinger 2008, Gardner & McCarthy 2009).

The brackish Berre lagoon (SE France) has been under strong anthropologic impacts through freshwater and nutrient inputs from its main natural tributaries (the Arc and Touloubre rivers) and moreover from the hydroelectric power plant implanted in 1966 at St. Chamas in the North (Bernard et al. 2007; Mars, 1966). Since then, freshwater inputs through the power plant have reached up to $6.630 \cdot 10^9 \text{ m}^3 \text{ y}^{-1}$ (almost seven times the lagoon's total volume). These loadings resulted in the decline of surface water salinity from 24-36 to 1-22 (Kim 1985) and in the development of strong salinity stratification around 5 m of the water column (Bernard et al. 2007; Minas et al. 1976; Stora et al. 1995) preventing gas exchanges with the bottom layer (Nerini et al. 2001; Stora and Arnoux, 1988). Uncontrolled anthropogenic activities in the surrounding areas for several decades led to a very strong eutrophication of the lagoon with chlorophyll-*a* concentration ranging from 2 to $100 \mu\text{g Chl}a \text{ L}^{-1}$ (Delpy et al. 2012). Highly colored surface water and hypoxia in the bottom layer were frequently observed (Becker, 1986; Bernard et al. 2007; Gouze et al. 2007; Minas, 1973) and led to strong changes in the structure and the functioning of this ecosystem with the extinction of various marine biological indicators, such as seagrasses and benthic macrofauna (Bernard et al. 2007; Gouze et al. 2007; Minas, 1974; Nerini et al. 2001; Stora et al. 1995).

In 1994, Barnier's management plan was firstly adopted to limit the freshwater loadings from the power plant into the lagoon. In 2005-2006, new managing strategies restricted the plant's loads to 1.3 times the lagoon's volume. Even though 2005-2006 were special years because of drought and freshwater inputs were, thus, lower than what they expected to be, Gouze et al. (2007) found that the power plant remains the main tributary of the lagoon doubling at least the annual natural discharge of nutrients, especially inorganic nitrogen and silt (60,000 tons of per year).

Despite these restrictions and the decrease in nutrient inputs over the past few years, there is still no sign of recolonization by the biological indicators (Gouze et al. 2008).

The role of the nutrients exchange between the sediments and the water column on eutrophication in this area is still unknown. The high dissolved inorganic nitrogen loads and the active ammonium and nitrate regeneration rates within the water column (Gouze et al. 2008), were nevertheless often unable to sustain primary production. As a matter of fact, sediments could play a major role in controlling the cycling and availability of nitrogen in coastal zones (Boynton & Kemp 1985, Giblin et al. 1997, Bonin et al. 1998, Hopkinson et al. 1999, Giblin et al. 2010) because the sharp gradient of oxygen within the sediments allows oxic nitrification, anoxic denitrification and anammox to operate in close proximity (Jenkins & Kemp 1984, Jensen et al. 1993, Jantti et al. 2011).

In this study, the evolution of nitrate levels since 1994 in the Berre lagoon as well as the qualification and quantification of the annual and seasonal nitrogen processes in its sediment were investigated. This would expand our understanding on the role of the bottom water and sediment activities in controlling the eutrophication state of the lagoon.

3. Material and Methods

3.1 Study area

The Berre lagoon is located in SE France (43°30'N and 5°10' E) and is one of the largest Mediterranean coastal lagoons (155 km²) (Fig. III.1) with a mean depth of 6 m and a maximum depth of 9.5 m for a total water volume of 980 million m³. It is connected to the sea through the Caronte Channel, in the south west corner, and receives freshwater and nutrients from its natural tributaries: the Arc and the Touloubre Rivers located in the north of the lagoon. In 1966, the hydroelectric power plant located at Saint-Chamas (northern part of the lagoon), collecting waters from the derivation canal of the Durance River started pouring large and uncontrolled volumes of freshwater and silt into the lagoon. (Bernard et al. 2007; Fèbvre, 1968; Mars, 1949; Nerini et al. 2011; Schachter, 1954). Inputs are largely dependent upon electricity demands, and thus show display seasonal and inter-annual variability (Bernard et al. 2007; Gouze et al. 2007; Nerini et al. 2011).

The two sampling stations were located in two contrasted area (i.e. different salinity patterns) of the lagoon. The first one, SA1, (43°29.735 N, 5°2.953E, bottom depth ~ 6 m) is located in the northern part of the lagoon directly under the influence of the hydroelectric power plant and the Arc and the Touloubre Rivers mouths, and is characterized by muddy sediment. The second one, SA3 (43°25.300N, 5°6.219 E, bottom depth ~ 9 m) is located in the southern part of the lagoon in front of the Caronte channel with sandy mud sediment typified of the area.

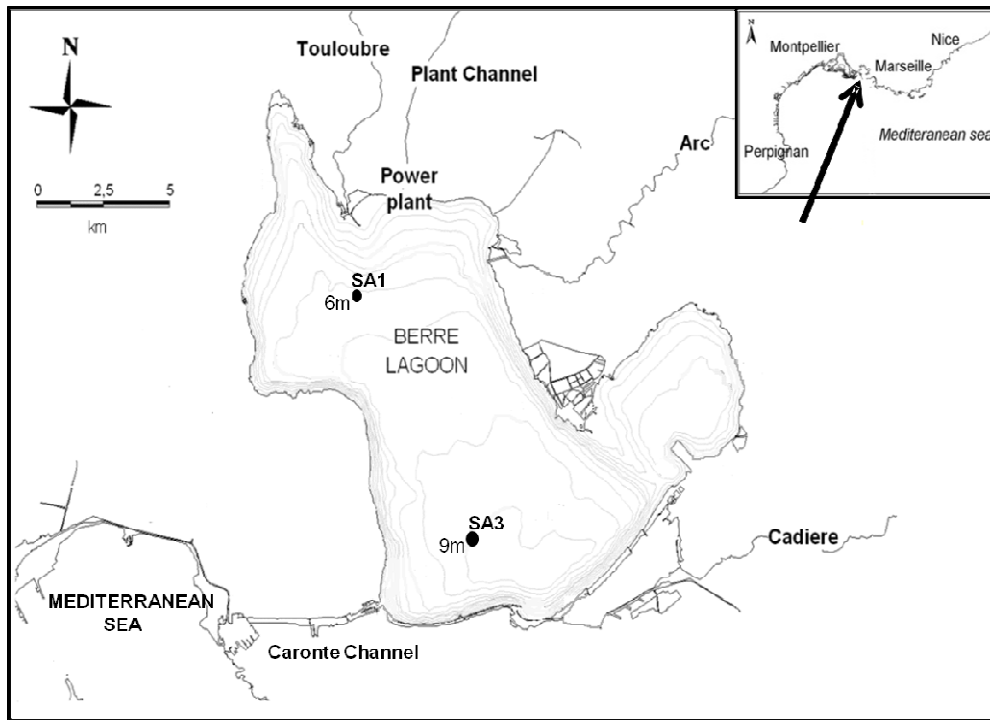


Fig. III. 1 Location of the sampling stations SA1 (43°29.735 N, 5°2.953E, ~6 m deep) and SA3 (43°25.300N, 5°6.219 E, ~9 m deep) in the Berre lagoon (SE France).

3.2 Sample collection

Since 1994, the GIPREB (Gestion intégrée, prospective et restauration de l'étang de Berre) is following, on a monthly basis, the quality of the Berre ecosystem by measuring among other parameters nitrate and ammonium concentrations. Vertical profiles are done using a CTD YSI and Hydrolab multi-probe. Probes are provided with depth, temperature, salinity, dissolved oxygen (concentration and saturation), pH, and turbidity sensors, calibrated at the beginning of each sampling mission. Their internal memory can record data for each station at each depth. Measures accuracy is ± 0.012 m for depth, $\pm 0.15\%$ for temperature, $\pm 1\%$ salinity, and $\pm 2\%$ for oxygen saturation. Probes are used at the same time during the entire follow-up period. Nitrate and

ammonium were determined by a colorimetric method (Koroleff 1969, Treguer & Le Corre 1975). In our case, we were interested in data of the bottom water layer.

During this study we also collected bottom water samples with a Niskin bottle, as well as sediments using box-cores (sediment depth of 8 cm) in April, July, September, November 2010 and February and April 2011. The cores were subsequently sub-sampled with acrylic tubes (length 12 cm, 3 cm inner diameter) without destroying the vertical structure of the sediment, filling the bottom half, of each tube, with sediment and the top half with bottom water. A total of 26 sub-cores were prepared from each site. During transportation, the 26 sub-cores were immersed at *in situ* temperature in bottom water and aerated to maintain oxygen gradients in the sediment, until the ^{15}N experiments were conducted.

3.3 Nutrient analysis

Five milliliters of synthetic seawater, nitrate/ nitrite free, were added to 5 ml of sediment, homogenized and centrifuged for 10 min at 1000 g. Biological active ammonium was extracted from sediment using KCl extraction method (Laima, 1993). In the interstitial water, nitrate and nitrite concentrations were measured using a Technicon-Auto-Analyser according to Treguer and Le Corre (1975). Ammonium concentrations in water and sediment were determined using the fluorometric method (Kérouel and Aminot, 1997). The loss-on-ignition (LOI%; combustion at 550  C for 12 h), reflecting sediment organic content, was measured from the top 1 cm of the sediment.

In this study, $[\text{NO}_3^-]_{\text{H.A}}$ and $[\text{NH}_4^+]_{\text{H.A}}$ will refer to the bottom nitrate and ammonium measured by the GIPREB, $[\text{NO}_3^-]_{\text{Bottom water}}$ and $[\text{NH}_4^+]_{\text{Bottom water}}$, the nitrate and ammonium measured in the bottom water during this study and $[\text{NO}_3^-]_{\text{sediment}}$ and

$[\text{NH}_4^+]_{\text{sediment}}$, the nitrate and ammonium measured in the sediment (particularly in the interstitial water) during this experiment.

3.4 Microbial activities

3.4.1 Experimental design

Back in the laboratory, sediment cores were immersed in an aquarium with 20 L containing bottom water kept at *in situ* temperature ($\pm 1^\circ\text{C}$) for 24 h to maintain the redox balance in the sub-cores.

The rates of the different processes, within the core, associated with the nitrogen cycle (ammonium production rates via mineralization, nitrification, nitrate reduction, Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium (DNRA), denitrification and anammox), were estimated using isotopic labeling ($^{15}\text{NO}_3^-$ or $^{15}\text{NH}_4^+$). The water column in each core was mixed using small magnetic stirrers driven by an external magnet (30 r.p.m.). At initial time incubation, the water was saturated with oxygen and has never reached below 70% of the air saturation by the end of the incubation. For each point of the time series (0, 2, 4 and 6 h): 2 mL HgCl_2 (50% w/w) were added in duplicates of sub-cores, and sub-cores were vigorously shaken.

For denitrification and anammox measurements, gas and slurry (mixture of the sediment + overlying water) were gently transferred in duplicates with a syringe from the core to 3 mL glass vials (Venoject, Therumo®) and 15 mL were stored for further isotopic analysis of dissolved inorganic nitrogen (-20°C). Rates of substrate consumption or product accumulation were then plotted against time and fitted to a linear model using the least squares method. Rates were calculated from the initial linear slope of the

curve and rate uncertainties were extrapolated from the results of the linear regressions.

3.4.2 Denitrification and anammox rates

These activities were estimated from the same incubated sets of cores. $^{15}\text{NO}_3^-$ was added (99.6% atom %, Isotec Mathesson) to the overlying water in three sets of cores with final concentrations of 80, 125 and 250 μM . For each point of time series, the headspace of the Venoject was injected into a mass spectrometer (Quadruple mass spectrometer Anagaz 100, MKS, England) and concentrations of $^{29}\text{N}_2$ and $^{30}\text{N}_2$, in addition to $^{28}\text{N}_2$, Ar and O_2 , were measured. As anammox calculated following Minjeaud et al. 2008 using the three different $^{15}\text{NO}_3^-$ labeling never exceeded a few percent of the total N_2 production rates, denitrification rates can be calculated according to Nielsen (1992). This method differentiates between denitrification based in NO_3^- in the overlying water (D_w , IPT) and that produced by nitrification (D_n , IPT).

3.4.3 DRNA rates

The dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) based on nitrate in the bottom water was measured in the set of cores containing 80 μM of $^{15}\text{NO}_3^-$. The progressive increase in isotopic enrichment of ammonium was monitored over time as the substrate (nitrate) was used. Immediately after the end of the incubation (0, 2, 4, and 6 h), the overlying water and the sediment in the core were homogenized and 3 mL of the mixture was transferred into a 50 mL screwed flask, 1 g of magnesium oxide (MgO) was added. Ammonium was extracted in diffusion packets (~90% NH_4^+ recovery) of acidified (25 μL , 0.5 N H_2SO_4) fiberglass filter (Whatman, GF/C). After addition of the

diffusion packet, flasks were immediately closed and incubated at room temperature at 60°C for one week. Thereafter, the diffusion packets were removed from the bottles and dried out on a desiccator. After one day of drying, the packets were disassembled and the fiberglass filters were packed into silver foil cups (Elemental Microanalyses). The ^{15}N content was analyzed by mass spectrometry (Integra CN mass spectrometer, SERCON) (Bonin 1996). The rates of dissimilatory ammonium production were calculated as previously described by Bonin et al. 1998.

3.4.4 Nitrate reduction rates

The total nitrate reduction rates were calculated by combining D_n , D_w , anammox and the DNRA rate (Dong et al. 2009, Jantti et al. 2011).

3.4.5 Nitrification rates

N_w (nitrification providing nitrate to the water column) was determined in core set amended with $^{15}\text{NH}_4^+$ (10 μM , less than 10% of the *in situ* ammonium concentration). The progressive increase in isotopic enrichment of nitrate was monitored over time as the substrate (ammonium) was used. After two successive extractions of $^{14,15}\text{NH}_4^+$ by microdiffusion, the remaining $^{14,15}\text{NO}_3^-$ within the flask was reduced chemically to ammonium with Devarda's alloy and subsequently microdiffused (Brooks et al. 1989). The rate of N_w was calculated from isotopic labeling of co-diffused nitrate and nitrite according to the equation developed by (Glibert et al. 1982). The total sediment nitrification rate includes then the nitrification providing NO_3^- to the water column (N_w) and the nitrification coupled to the denitrification (D_n , IPT) (Jantti et al. 2011).

3.4.6 Ammonium produced by mineralization

For the remaining set of cores, the ammonium production rates via mineralization were calculated from the isotopic dilution of $^{15}\text{NH}_4^+$ amongst the $^{14}\text{NH}_4^+$ produced by mineralization of organic matter. Ammonium was extracted from the solution by microdiffusion, as described above. The isotopic ratio of the extracted nitrogen was analyzed with a mass spectrometry (Integra CN mass spectrometer, SERCON).

3.5 Statistical analysis

Spatial and temporal variations in nitrogen processes were described using hierarchical analyses of variance (ANOVA).

Statistical relationships between the observations were investigated using Pearson's Correlation and were performed using XLSTAT® software package.

4. Results

4.1 Physico-chemical characteristics of the overlying water and sediments from 1994 to 2010

For the period of 1994-2010, the bottom salinity values ranged from 7 to 30 and from 11 to 31 at stations SA1 (Fig. III.2a) and SA3 (Fig. III.2b) respectively, and were significantly different between stations (Table III.1). Both sites were impacted by the massive freshwater inflows through the power plant. A clear transition in the salinity pattern appeared. Before 2005-2006, the salinity showed important fluctuations (Fig. III.2). After 2005-2006, a net trend towards increase in salinity was observed. Lower salinity never reached values lower than 15 at the both stations (Fig. III.2). Maximum values were around 30 and 31 for SA1 and SA3 respectively. During winter 2009 and 2010, lower salinity was linked to important flood events and increasing loadings of freshwater from the power plant due to a higher energy demand.

Nitrate concentrations measured at both stations are reported in Figures III.2c and d. Significantly higher values were observed at SA1 than at SA3 (Table III.1). Between 1994 and 2010 nitrate concentrations did not show any clear inter-annual pattern. Before 2005-2006, annual mean ranged from $7.4 \pm 9.8 \mu\text{M}$ to $5.6 \pm 8.5 \mu\text{M}$ at SA1 (Fig. III. 2c) and SA3 (Fig. III. 2d), respectively occasionally reaching up to $39 \mu\text{M}$ (February 2004) and $31 \mu\text{M}$ (January 2004). Between 2005 and 2008, mean values were even lower with $4.2 \pm 5.7 \mu\text{M}$ and $1.8 \pm 3.7 \mu\text{M}$ reported at SA1 and SA3, respectively. In 2009-2010, nitrate concentrations increased (Fig. III. 2c, d) reaching $12 \pm 11.3 \mu\text{M}$ at SA1 and $7.4 \pm 9.4 \mu\text{M}$ at SA3. NH_4^+ concentrations, at both stations (Fig. III.2e, f) were between $0.59 \pm 0.18 \mu\text{M}$ and $4.04 \pm 3.26 \mu\text{M}$ at SA1 and $0.8 \pm 0.24 \mu\text{M}$ and $4 \pm 4.4 \mu\text{M}$ at SA3, and they did not show any specific pattern, even though higher values have been reported at SA1 since 2006.

Table III.1 : ANOVA analysis comparing the stations (SA1 and SA3), time (season) and sediment layers for environmental parameter and bacterial N-processes. When a significant effect is found with 'Time', the month with maximal activity is indicated. Ns: not significant; * $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.**

	Station	Month
Environmental parameters		
Salinity	*** ($R^2=0.34$, $n=192$) SA1 < SA3	*** ($R^2=0.34$, $n=192$) Autumn-Spring > winter
$[\text{NO}_3^-]_{\text{H.A}}$	** ($R^2=0.43$, $n=192$) SA1 > SA3	*** ($R^2=0.43$, $n=192$) Winter > Summer
$[\text{NO}_3^-]_{\text{bottom water}}$	ns	ns
$[\text{NH}_4^+]_{\text{bottom water}}$	ns	ns
$[\text{O}_2]_{\text{bottom water}}$	ns	ns
$[\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-]_{\text{sediment}}$	ns	ns
$[\text{NH}_4^+]_{\text{sediment}}$	ns	ns
LOI (%)	ns	ns
Bacterial N-process		
NaR	ns	* ($R^2=0.35$, $n=36$) Autumn > Summer-Winter
Anammox	ns	Ns
Dn	ns	*** ($R^2=0.54$, $n=36$) Autumn > Summer-Winter
Dw	ns	* ($R^2=0.32$, $n=36$) Autumn > Winter-Spring
Dtot	ns	*** ($R^2=0.66$, $n=36$) Autumn > Summer-Winter
DNRA	ns	Ns
Nitrification	ns	Autumn > Summer-Winter ** ($R^2=0.45$, $n=36$) Summer > Winter
Mineralization	ns	*** ($R^2=0.649$, $n=24$)

$[\text{NO}_3^-]_{\text{H.A}}$ refers to the bottom nitrate measured by the GIPREB, $[\text{NO}_3^-]_{\text{Bottom water}}$ and $[\text{NH}_4^+]_{\text{Bottom water}}$, the nitrate and ammonium measured in the bottom water during this study and $[\text{NO}_3^-]_{\text{sediment}}$ and $[\text{NH}_4^+]_{\text{sediment}}$, the nitrate and ammonium measured in the sediment (particularly in the interstitial water) during this experiment.

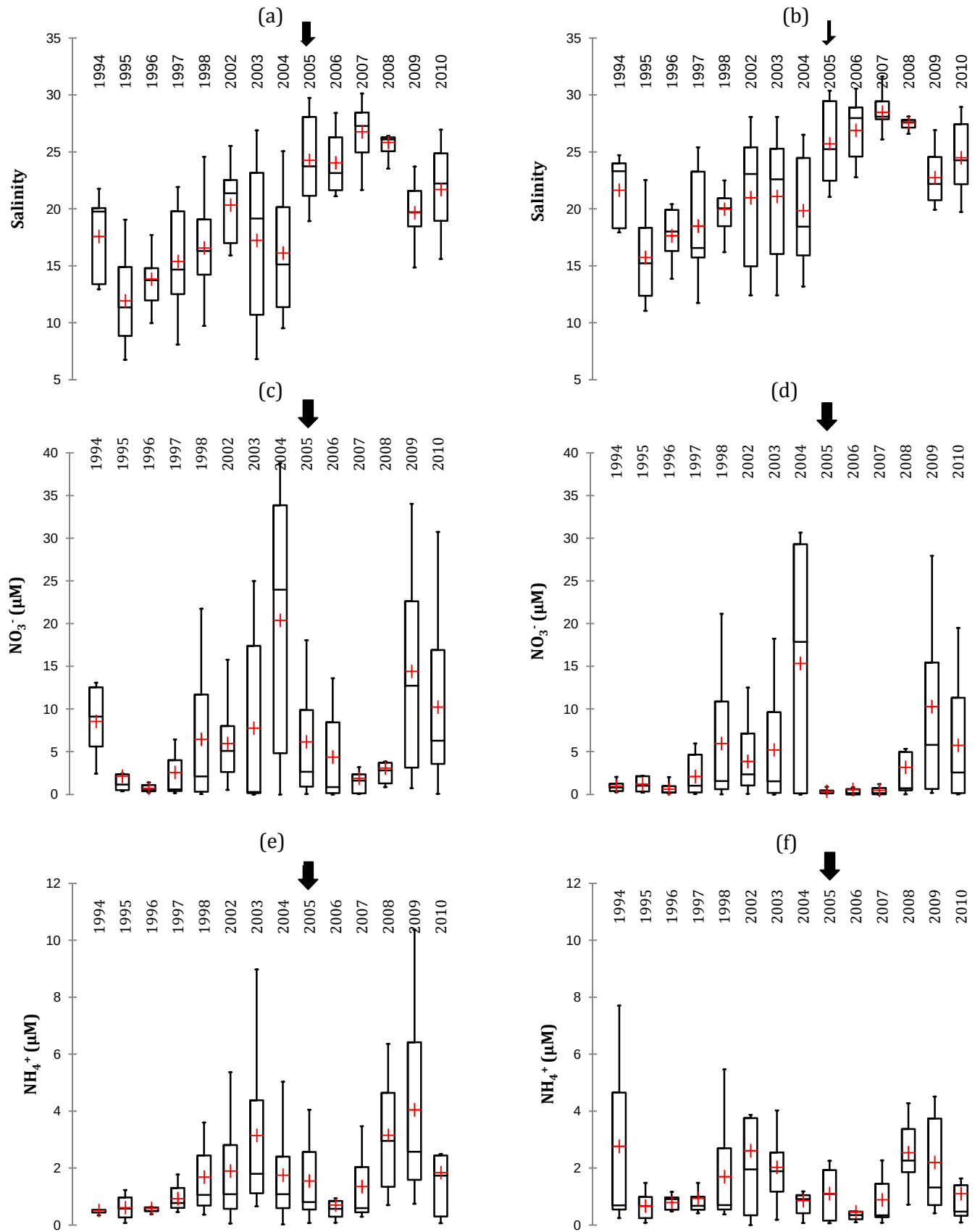


Fig. III. 2 Box plot comparing annual evolution of salinity values (a, b), nitrate (c, d) and ammonium (e, f) concentrations, in SA1 and SA3 respectively. These physical and chemical parameters were measured in the bottom layer of both

stations. Arrows mark the year of effective restriction in freshwater and nutrient loadings. Box plot: the center vertical line marks the median, the edges of the box mark first and third quartiles and the vertical lines indicate the range of values that fall within 1.5 (midrange) of the hinges, the cross marks the mean value (n= 192 for each parameter of every station).

The physical and chemical characteristics of the bottom water layer and the surface sediment did not follow any seasonal cycle at both stations. The lowest LOI % was recorded when temperatures were the highest (September). When temperature dropped, LOI% decreased. However, $[\text{NO}_3^-]$ bottom water, $[\text{NO}_3^-]$ surface sediment, $[\text{NH}_4^+]$ bottom water, $[\text{NH}_4^+]$ surface sediment and $[\text{O}_2]$ bottom water concentrations did not correlate with each other or with salinity (Table III.2). Oxygen decrease was noticeable at relatively shallow depths (5 m), hypoxia has been measured in July 2010, particularly in SA3 (40% of oxygen saturation) (Fig. III.3). In surface sediments, oxygen diffused only to 1.5 mm at both station, whatever the sampling periods (data not shown).

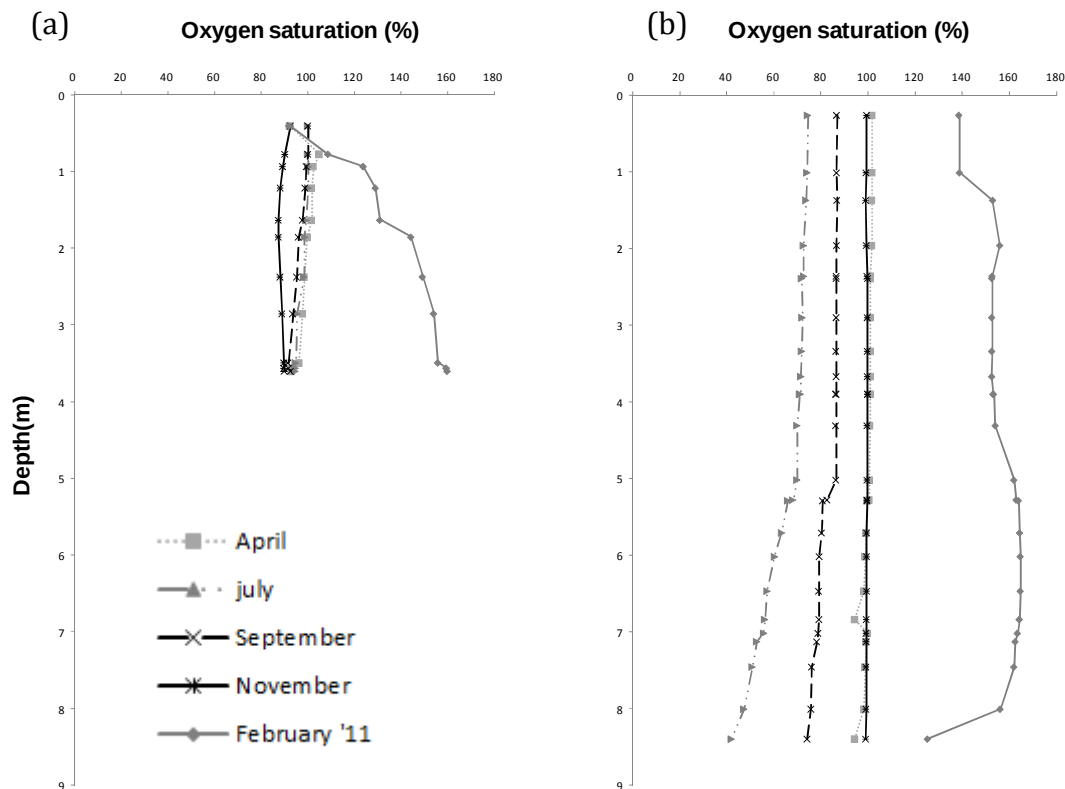


Fig. III. 3 Mean oxygen saturation (%) profiles at SA1 (a, to 4 m depth, n=11) and SA3 (b, to 9 m depth, n=26) from 1994 to 2011.

Table III.2 Temperature, salinity in the bottom water and DIN concentrations in the bottom water and sediments, from April 2010 to April 2011, at SA1 and SA3.

Sampling time	April 2010		July 2010		September 2010		November 2010		February 2011		April 2011	
	SA1	SA3	SA1	SA3	SA1	SA3	SA1	SA3	SA1	SA3	SA1	SA3
Bottom water												
T (°C)	13.9	13.1	19.0	18.7	20.6	20.2	13.3	15.9	5.9	5.7	16.0	14.6
Salinity	21	33	20	30	22	23	27	33	22	33	24	33
[NO ₃ ⁻] μM	36.7	6.1	6.3	7.4	1.8	0.2	6.1	5.6	0.3	54.9	21.1	2.5
[NO ₂ ⁻] μM	0.9	1.4	20.5	20.5	0.1	0.03	0.5	0.7	0.2	0.2	0.6	1.9
[NH ₄ ⁺] μM	9.55	3.94	2.75	6.96	1.87	1.6	5.93	6.34	3.36	1.17	3.34	1.14
[O ₂] mg/l	8.13	10.7	6.54	2.82	7.01	5.28	8.82	9.16	17.64	10.4	8.2	11
sediment												
[NO ₃ ⁻ + NO ₂ ⁻] μM	1.1	1.5	1.3	1.1	1	1.5	1.4	2.2	2.1	1.3	1.5	2.1
[NH ₄ ⁺] μM	285.0	388.4	345.5	286.2	297.2	438.7	304.8	518.3	107.2	61.3	234.0	215.6
LOI (%)	14.4	13.6	9.7	10.3	8.4	13.2	10.1	12.0	12.8	16.1	12.0	14.1

4.2 Bacterial activities

The Dissimilatory reduction of nitrate to nitrite (NaR) is an anaerobic reaction. It is a step prior to three anaerobic nitrate reduction processes: DNRA, denitrification and anammox (Bonin et al. 1998).

Mean NaR rates ($\text{NaR} = D_n + D_w + \text{DNRA} + \text{Anammox}$) were calculated at both stations ($12.29 \pm 5.77 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ at SA1 and $24.47 \pm 6.05 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ at SA3). Nitrate reduction rates followed a seasonal pattern (Table III.1). Maximum rates were observed in November at both stations ($31.72 \pm 6.85 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ at SA1 and $42.96 \pm 26.88 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ at SA3) (Fig. III.4).

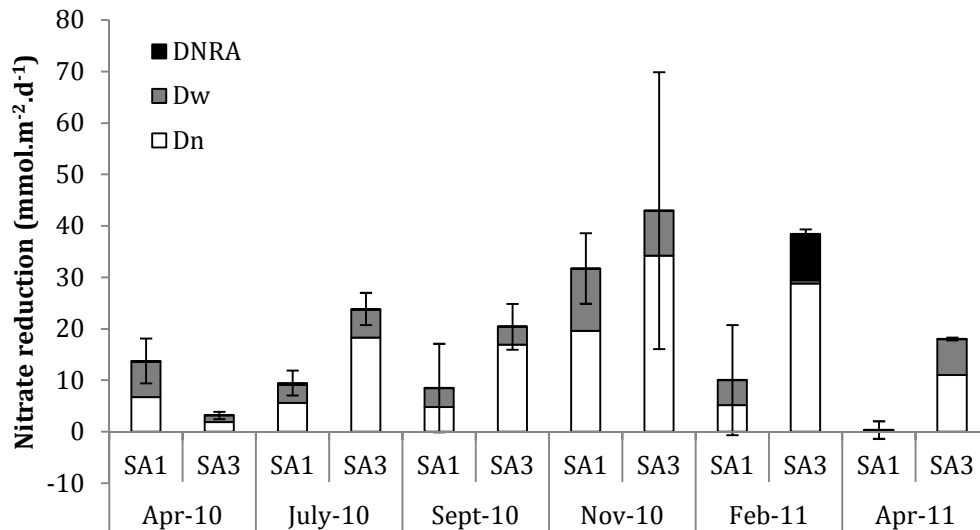


Fig. III. 4 Nitrate reduction pathway and SE comprising coupled nitrification-denitrification (Dn, in white), denitrification based on NO_3^- in the bottom water (Dw, in grey), dissimilatory nitrate reduction to ammonia (DNRA, in black) and anammox (not detected), $n=12$.

Overall, denitrification seemed to be the main process responsible for the N_2 removal from the ecosystem. Anammox was not detected at any of the two stations. In late autumn, total denitrification showed the highest rates ($31.7 \pm 10.35 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ at SA1 and $42.95 \pm 9.15 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ at SA3 (Fig. III.5) nearly two folds that observed in spring (Fig. III.5, Table III.1). D_n rates were about six times higher than D_w rates, at both stations and at all time (Fig. III.5).

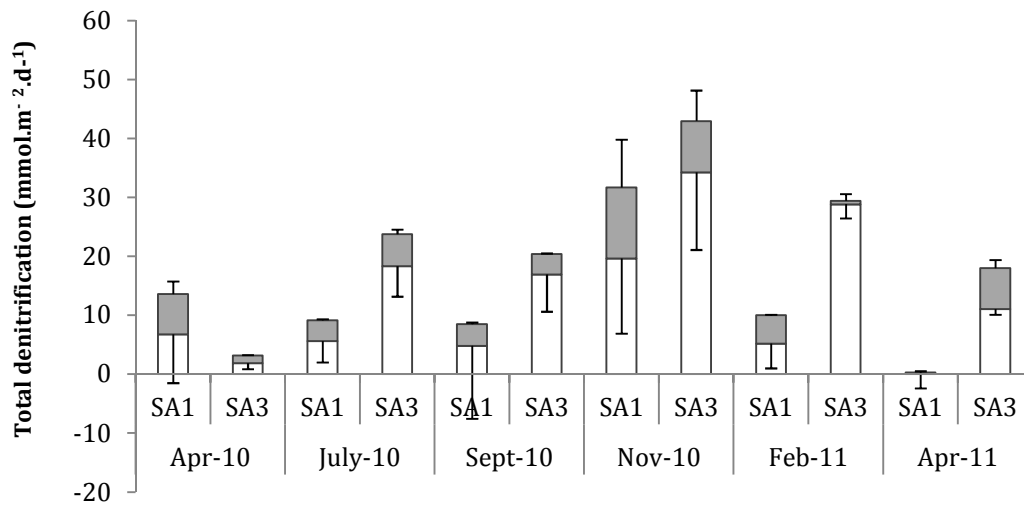


Fig. III. 5 Total denitrification rates and SE, comprising coupled nitrification-denitrification (Dn, in white) and denitrification based on NO_3^- in the bottom water (Dw, in grey), $n=12$.

Total nitrification rates were measured here by combining nitrification coupled to nitrification (D_n , IPT) and nitrification producing NO_3^- to the water column (N_w , $^{15}\text{NH}_4^+$ oxidation) (Fig. III.6). As for denitrification, nitrification showed low rates in spring that nearly increased by two folds during summer and tripled by late autumn and then decreased through winter (Fig. III.6). NaR, denitrification and nitrification rates were higher at SA3 than at SA1, with the exception of April 2010 (Fig. III.4, 5, 6).

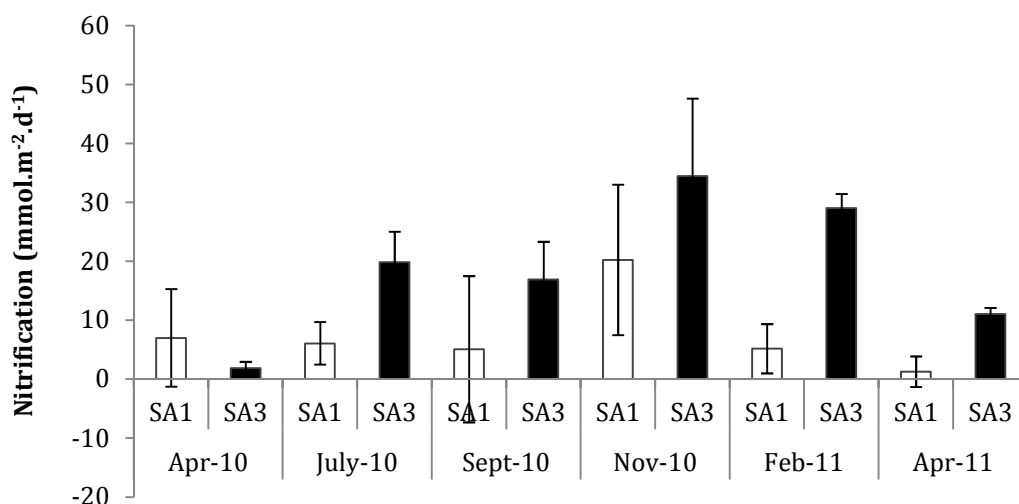


Fig. III. 6 Total nitrification rates and SE, comprising nitrification coupled to denitrification (Dn) and nitrification producing NO₃⁻ to the water column (Nw), n=12.

The mineralization pathway, consisting of the apparent ammonium production (from mineralization of the organic matter within the sediments) and the total nitrification, showed the highest rate in summer at SA3 (reaching 97.32 ± 5.17 mmol.m⁻².d⁻¹), while at SA1, rates were rather similar throughout the year (Fig. III.7), with the exception of April 2010.

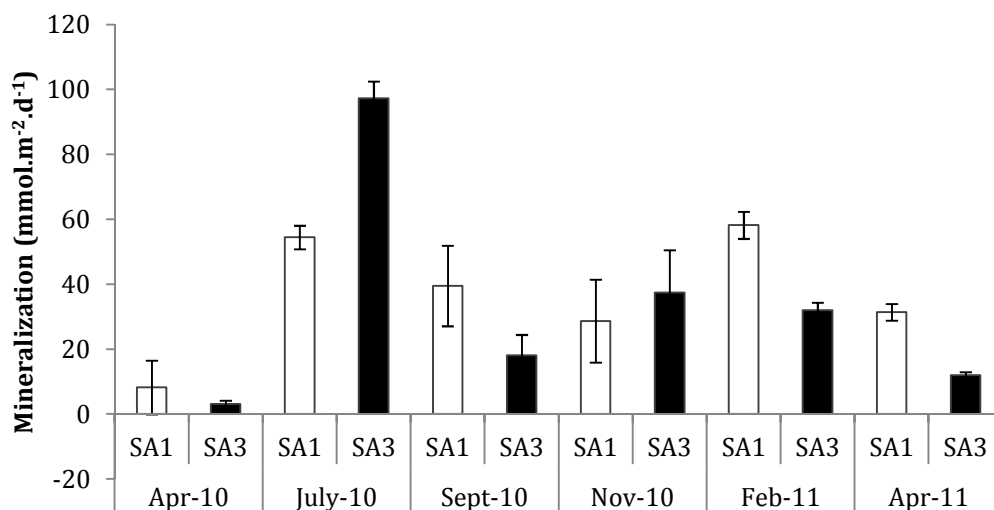


Fig. III. 7 Mineralization rates and SE, comprising the apparent ammonium production and the total nitrification, n=12.

5. Discussion

Despite the new strategies of freshwater and nutrient inputs, our results showed that these restrictions did not clearly impact the nitrate concentrations in the water column. It also seemed that NH_4^+ availability was caused by a high organic content in the sediment and the water column. Salinity conditions have progressed with values no longer falling below 15, and reaching up to 30-31. Despite increasing salinities, stratification still persists particularly in the southern deeper areas of the lagoon (GIPREB, 2010). It prevents complete mixing of the water column, and leading in connection with excessive nutrient loads from the drainage basin to hypoxia (Zillen et al. 2008). Hypoxia further fuels eutrophication because it enhances phosphorus (P) and nitrogen (N) release from sediment. Increased N and P availability stimulates primary production, which in turn causes higher decomposition and depleting O_2 (Vahtera et al. 2007). In 2005-2006, the primary production in the Berre lagoon was higher by one or two orders of magnitude than the adjacent seawater (Mediterranean) (Gouze et al. 2008). These authors suggested some hypothesis to explain this high primary production, including nitrogen removal processes within the sediment that could counteract eutrophication (Gouze et al. 2008).

N can be removed from the water column by anammox and denitrification processes (Capone 2000), where nitrate and nitrite are reduced into dinitrogen (N_2) (Thamdrup & Dalsgaard 2002, Zehr & Kudela 2011). In our study, anammox was not detected probably because the Berre lagoon does not provide an optimal habitat for anammoxifiers. This was already reported by (Minjeaud et al. 2009) in the coastal sediment of the nearby Gulf of Fos (SE France) where anammox occurred only occasionally while at time it accounted for up to 39% of the N_2 production.

Denitrification rates in coastal sediments are usually higher than rates measured in continental shelf sediments (Lohse et al. 1993, Hietanen & Kuparinen 2008). Denitrification activities observed in the Berre lagoon sediments are among the highest ones reported in the literature for estuaries, with up to $14.25 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ for the Tama estuary and $25.6 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ for the Tejo estuary (Nishio et al. 1983, Seitzinger 1988). Whereas the remaining nitrate in the bottom water had only a minor effect on total denitrification rate, it was closely connected to the nitrate produced by nitrification in the sediment. In the Berre lagoon, D_{tot} (Total denitrification = $D_n + D_w$) originates largely from D_n (from 60 to 80%), highlighting the nitrification-denitrification coupling role in the removal of substantial amounts of ammonium from the ecosystem (Lohse et al. 1993). The highest denitrification rates occurred in late autumn when nitrate inputs were highest (Table III.2) and NO_3^- uptake (primary production) limited by nitrate availability (Fig. III.8b). In addition to hypoxia, salinity variations in the Berre lagoon are of a great concern and are thought to act on the eutrophication state of the lagoon. In our study, denitrification rates were not correlated to salinity values. This is in line with several previous studies that reported no effect between denitrification and salinity changes (Nielsen et al. 2001, Fear et al. 2005, Magalhaes et al. 2005), whereas other studies showed an inverse relationship between denitrification rates and salinity (Rysgaard et al. 1999, Laverman et al. 2007, Giblin et al. 2010).

A relationship could exist between high LOI% and high denitrification rates. The most obvious reason is that denitrifying bacteria are heterotrophic and depend upon organic carbon as their energy source (Jantti & Hietanen 2012). Also, when organic carbon availability was high, nitrification rates were high, which provided NO_3^- for denitrification (Fig. III.5, 6). Dong et al. (2000) reported also a significant positive

correlation between high denitrification rates in sediments with elevated organic carbon content.

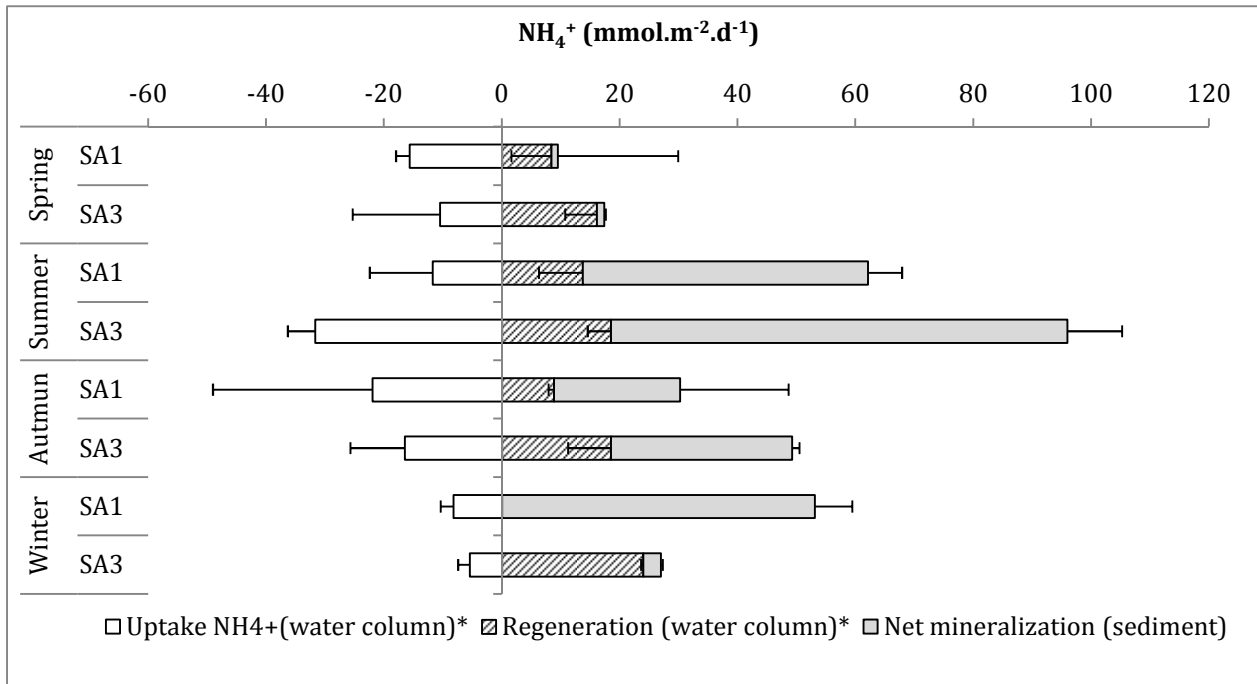
Nitrification rates measured in the Berre lagoon showed over that one year survey a seasonal pattern with highest activity occurring in late autumn, when $[\text{NH}_4^+]$ released from the sediments is the highest. The high availability of O_2 and NH_4^+ in the sediment and the bottom water increased nitrification (Table III.2). Our results showed no effect of salinity on nitrification activity. In the literature, nitrification was nevertheless reported to be either inhibited (Rysgaard et al. 1999, Campos et al. 2002, Bernhard et al. 2005) or stimulated when salinity increased (Magalhaes et al. 2005).

The dissimilative rate of nitrate reduction into ammonium (DNRA), maintains however available nitrogen for primary producers. In the Berre lagoon sediments, except in February 2011, rates were low and their contribution to the NH_4^+ flux seemed to be insignificant. Mineralization is a regeneration process that transforms organically bound nitrogen to NH_4^+ , a biologically available form for both bacteria and phytoplankton. This regenerated nitrogen has several potential fates; it may diffuses towards the overlying water, be assimilated by the trophic chain, or be nitrified and then denitrified, resulting in a net loss of nitrogen for the ecosystem.

Although nutrient inputs into the Berre lagoon have decreased over the past few years, in relation to freshwater discharge restrictions and sewage treatments (Gouze et al. 2008), the fate of nutrients and the causes of massive phytoplankton blooms are still not fully understood. (Eyre & Ferguson 2002) showed that the relative percentages of the different forms of nitrogen ex-fluxing from the sediment into the water column have important implications for the trophic status of coastal lagoons. Ammonium (Fig. III.8a)

and nitrate (Fig. III.8b) budgets were established from our dataset and that provided by Gouze et al. (2008). Gouze et al. (2008) showed that the annual N-NH_4^+ pelagic regeneration in the water column ($\sim 20,000 \text{ tons.y}^{-1}$) and the annual N-NH_4^+ inputs from atmospheric deposits ($\sim 39 \text{ tons.y}^{-1}$), tributaries ($\sim 33 \text{ tons.y}^{-1}$) and sea water ($\sim 11 \text{ tons.y}^{-1}$) could generally support the pelagic uptake ($\sim 15\,500 \text{ tons.y}^{-1}$). During summer, N-NH_4^+ pelagic regeneration and external inputs sustained only 60 to 77% of the ammonium uptake (Gouze et al. 2008).

(a)



(b)

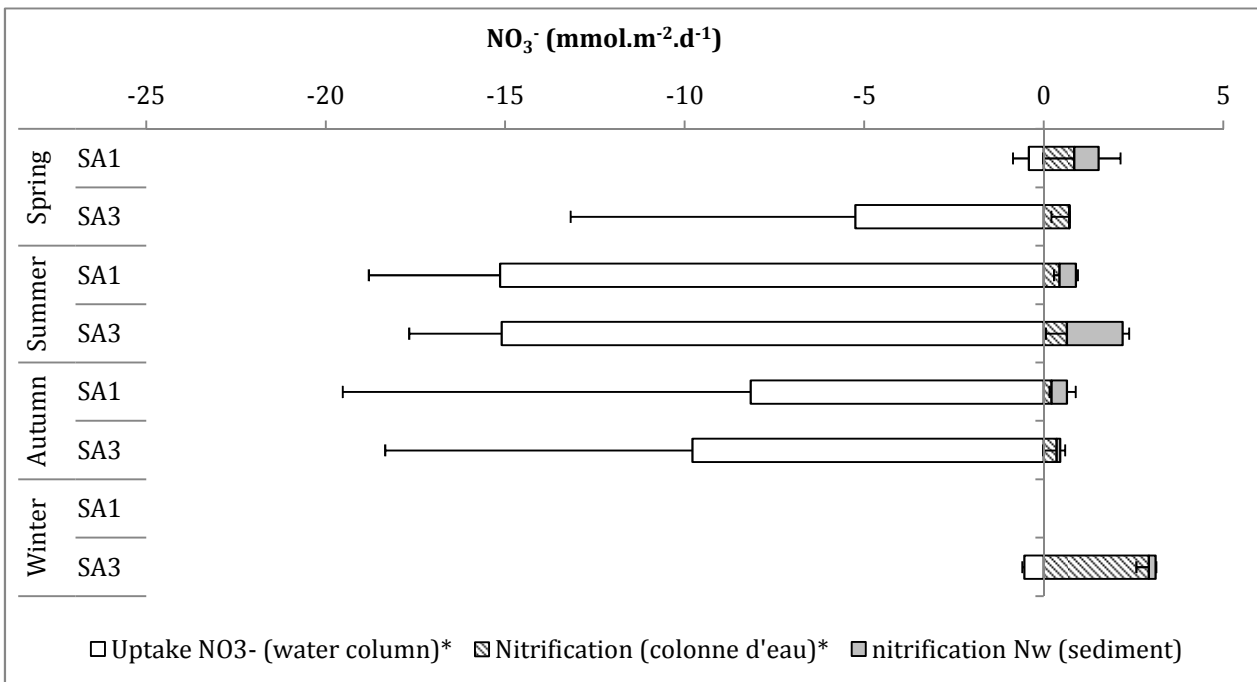


Fig. III. 8 (a) Ammonium N- NH_4^+ budget and SE comprising pelagic uptake, water column regeneration and sediment net mineralization, (b) nitrate N- NO_3^- budget and SE comprising pelagic uptake, net nitrification pelagic and nitrification producing NO_3^- to the water column (Nw), (*pelagic uptake and water column regeneration data were collected from Gouze et al. (2008) in the same stations.

Based on our mineralization results (Fig. III.7), the estimated net ammonium mineralization from sediment ($\sim 7,000 \text{ tons.y}^{-1}$) could sustain this uptake. Nitrate uptake is far more important than the regenerated nitrate from both the water column and the sediments. According to Gouze et al. (2008), nitrate produced by the pelagic net nitrification ($\sim 500 \text{ tons.y}^{-1}$) was insufficient to explain the nitrate uptake ($\sim 4000 \text{ tons.y}^{-1}$). The exogenous N-NO_3^- inputs reached $\sim 92 \text{ tons.y}^{-1}$ from the atmospheric deposits, $\sim 506 \text{ tons.y}^{-1}$ from the tributaries and $\sim 30 \text{ tons.y}^{-1}$ from the seawater. Gouze et al. (2008) estimated that there is a deficit of $\sim 3000 \text{ tons}$ of N-NO_3^- , N_w providing only $\sim 34 \text{ tons.y}^{-1}$. The deficit in nitrate budget could be explain by an underestimation of the nitrification flux in the water column as nitrate produced by nitrification could instantaneously be taken up by phytoplankton in such dynamic ecosystem, despite the large amount of available ammonium which is the favorite phytoplankton form of nitrogen. Thus, nitrogen returned as NH_4^+ and nitrate may further stimulate productivity in the water column, resulting in the delivery of more organic matter to the sediments and leading to greater decomposition. In contrast, nitrogen returned as N_2 (denitrification) is lost from the system, which helps to reduce the effects of nutrient enrichment.

Relating the denitrification flux to the remineralization flux allowed us to estimate the denitrification efficiency for this system. Denitrification efficiency is in fact the percentage of inorganic nitrogen (DIN) released from the sediment as dinitrogen gas (N_2) during the decomposition of organic matter: $(\text{N}_2\text{-N} / (\text{DIN} + \text{N}_2\text{-N}) * 100)$ (Eyre & Ferguson 2002). In our study, denitrification efficiency has reached 29.5% at SA1 and 59% at SA3, suggesting that denitrification is therefore an important N_2 removal pathway. $24,000 \text{ tons.y}^{-1}$ of nitrogen is thus eliminated from the Berre lagoon as N-N_2 including $17,000 \text{ tons.y}^{-1}$ being done through the coupled nitrification denitrification

process. Thus, most of the removed nitrogen through denitrification comes from ammonium pool. It seems that NH_4^+ availability is caused by high levels of particulate organic nitrogen in the sediment brought by high silt inputs (Gouze et al. 2008) rather than ammonium inputs by the tributaries which represent only 83 tons of N-NH_4^+

6. Conclusion

The Berre lagoon is largely conditioned by the nature and the quantity of inputs (freshwater, nutrients, organic matter) from its tributaries (rivers and hydroelectric power plant). The contribution of sediment in the storage and the release of different nitrogen forms may partly explain the regeneration of nitrogen and thus, respond to the pelagic demand. To highlight the role of sediment as a source of nitrogen nutrients, seasonal patterns of ammonium assimilation rates, net nitrification, nitrate reduction (NaR), Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium (DNRA), denitrification and anammox were quantified in two sampling stations: SA1 situated north of the lagoon and subject to freshwater inflows and SA3 which was located south of the lagoon and under marine influence. Results revealed that 60-80% of the nitrate formed by nitrification was denitrified (Dn). Denitrification was the only process responsible of the dinitrogen production and elimination of nitrogen in excess in the Berre lagoon ecosystem. DNRA was a process of a low magnitude and less than 10% of the reduced nitrate was converted to NH_4^+ .

Berre lagoon is still a very productive ecosystem, with a high primary production. Regeneration processes within the sediment were active, and could, at least partially, sustain the pelagic demand. Several factors could also explain this high primary production such as an underestimation of atmospheric deposits, of the amount of marine waters entering the lagoon from the Mediterranean Sea, an underestimation of regeneration and nitrification processes within the water column and the sediment, and/or benthos death and degradation. Ammonium regeneration rates in sediment were relatively high comparing to values reported for the water column at same sampling

sites. The high primary production based on ammonium as N source may be explained by the ammonium regeneration rates and was responsible of eutrophication event. All these nitrogen sources could cause massive phytoplankton blooms and might explain the accumulation of N-NH_4^+ in the bottom.

The Berre lagoon seems to be a “sink” and a “source” for nutrients. Despite the decrease in nitrogen inputs and the stabilization of the salinity between 15 and 25, the Berre lagoon still presents the characteristics of a highly eutrophic environment.

7. Acknowledgements

The authors are thankful to CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique), Université Aix Marseille II – Mediterranean, Grants from the INSU -EC2CO – Microbien 2010 program and ANR Izoflux. I.Zaghmouri is granted by fellowship of the Tunisian Ministry of Education, Scientific Research and Technology. I. Zaghmouri also thanks Delphine Botha for the English and for her helpful comments on the paper.

8. References:

- Aliaume, C., Do Chi, T., Viaroli P., Zaldivar, J.M., 2007. Coastal lagoons of Southern Europe: recent changes and future scenarios. *Trans. Wat. Mono.* 1, 1-12.
- Becker, B., 1986. Communautés phytoplanctoniques en milieu côtier à salinité variable (étang de Berre et golfe de Fos). Doctoral thesis, University of Aix-Marseille, France.
- Bernard, G., Boudouresque, C.F., Picon, P., 2007. Long term changes in *Zostera* meadows in the Berre lagoon (Provence, Mediterranean Sea). *Est. Coast. Shelf. Sci.* 73, 617-629.
- Bernhard, A.E., Donn, T., Giblin, A.E., Stahl, D.A., 2005. Loss of diversity of ammonia-oxidizing bacteria correlates with increasing salinity in an estuary system. *Env. Microb.* 7, 1289–1297.
- Bernhard, A.E., Tucker, J., Giblin, A.E., Stahl, D.A., 2007. Functionally different communities of ammonia oxidizing bacteria along an estuarine salinity gradient. *Env. Microb.* 9, 1439–1447.
- Bonin, P., 1996. Anaerobic nitrate reduction to ammonium in two strains isolated from coastal marine sediment: A dissimilatory pathway. *Fems Microb. Ecol.*, 19, 1067-1077.
- Bonin, P., Omnes, P., Chalamet, A., 1998. Simultaneous occurrence of denitrification and nitrate ammonification in sediments of the French Mediterranean Coast. *Hydro.* 389, 169–182.
- Bowen, J.L., Valiela, I., 2001. The ecological effects of urbanization of coastal watersheds: historical increases in nitrogen loads and eutrophication of Waquoit Bay estuaries. *Cana. J. Fish. Aqua. Sci.* 58, 1489-1500.
- Boynton, W.R., and Kemp, W.M., 1985. Nutrient regeneration and oxygen consumption by sediments along an estuarine salinity gradient. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 23, 45–55.
- Brock, D.A., 2001. Nitrogen budget for low and high freshwater inflows, Nueces Estuary, Texas. *Est.* 24, 509–521.

- Brooks, P.D., Stark, J.M., Mcinteer, B.B., Preston, T., 1989. Diffusion method to prepare soil extracts for automated nitrogen-15 analysis. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 53, 1707–1711.
- Burgin, A.J., Hamilton, S.K., 2007. Have we overemphasized the role of denitrification in aquatic ecosystems? A review of nitrate removal pathways. *Ecol. Soc. Amer. J.* 5, 89–96.
- Cadée, N., Dronkers, J., Heip, C.H.R., Martin, J.M., Nolan, C., 2001. European Land–Ocean Interaction Studies, Science Plan, Ecosystem Research Report 11. European Commission, Luxembourg.
- Campos, J.L., Mosquera-Corral, A., Mendez, R., Lema, J.M., 2002. Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in an activated sludge unit. *Wat. Res.* 36, 2555–2560.
- Capone, D.G., 2000. The marine microbial nitrogen cycle. Wiley-Liss Inc, New York, 455-494.
- Cloern, J.E., 2001. Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 210, 223-253.
- Codispoti, L.A., and Christensen, J.P., 1985. Nitrification, denitrification and nitrous oxide cycling in the eastern tropical South Pacific Ocean. *Mar. Chem.* 16, 277-300.
- Crossland, C.J., Kremer, H.H., Lindeboom, H.J., Marshall Crossland, J.I., Le Tissier, M.D.A., 2005. Coastal Fluxes in the Anthropocene. The Land-Ocean Interactions in the Coastal Zone Project of the International Geosphere - Biosphere Programme. *Global Change - The IGBP*, 20- 232.
- Delpy, F., Pagano, M., Blanchot, J., Carlotti, F., Thibault-Botha, D., 2012. Man-induced hydrological changes, metazooplankton communities and invasive species in the Berre Lagoon (Mediterranean Sea, France). *Mar. Poll. Bull.* 64, 1921-1932.
- Dong, L.F., Thornton, D.C.O., Nedwell, D.B., Underwood, G.J.C., 2000. Denitrification in sediments of the River Colne estuary, England. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 203, 109-122.
- Dong, L.F., Smith, C.J., Papaspyrou, S., Stott, A., Osborn, A.M., David, B., Nedwell, D.B., 2009. Changes in benthic denitrification, nitrate ammonification, and anammox process rates

and nitrate and nitrite reductase gene abundances along an estuarine nutrient gradient (the Clone estuary, United Kingdom). *App. Env. Microb.* 75, 3171-3179.

Eyre, B.D., Ferguson, A.J.P., 2002. Comparison of carbon production and decomposition, benthic nutrient fluxes and denitrification in seagrass, phytoplankton, benthic microalgae- and macroalgae-dominated warm-temperate Australian lagoons. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 229, 43-59.

Fear, J.M., Thompson, S.P., Gallo, T.E., Paerl, H.W., 2005. Denitrification Rates Measured Along a Salinity Gradient in the Eutrophic Neuse River Estuary, North Carolina, USA. *Est.* 28, 608-619.

Fèbvre, J., 1968. Etude bionomique des substrats meubles de l'étang de Berre. *Recueil des Travaux de la Station Marine d'Endoume*, 44, 298-355.

Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erisman, J.W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J.R., Martineli, L.A., Seitzinger, S.P., Sutton, M.A., 2008. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Sci.* 320, 889-897.

Gardner, W. S., McCarthy, M. J., An, S., Sobolev, D., Sell, K. S., Brock, D., 2006. Nitrogen fixation and dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) support nitrogen dynamics in Texas estuaries. *Limn. Ocean.* 51, 558-568.

Gardner, W.S., McCarthy, A.M.J., 2009. Nitrogen dynamics at the sediment-water interface in shallow, sub-tropical Florida Bay: why denitrification efficiency may decrease with increased eutrophication. *Biogeo.* 95, 185-198.

Giblin, A.E., Weston, N.B., Banta, G.T., Tucker, J., Hopkinson, C.S., 2010. The Effects of Salinity on Nitrogen Losses from an Oligohaline Estuarine Sediment. *Est. Coasts.* 33, 1054-1068.

Giblin, A.E., Hopkinson, C.S., Tucker, J., 1997. Benthic metabolism and nutrient cycling in Boston Harbor, Massachusetts. *Est.* 20, 346-364.

Glibert, P., Lipschultz, F., McCarthy, J., Ma, A., 1982. Isotope dilution models of uptake and remineralization of ammonium by marine plankton. *Limn. Ocean.* 27, 639-650.

- Gouze, E., Raimbault, P., Garcia, N., Bernard, G., Picon, P., 2007. Nutrient and suspended matter discharge by tributaries into the Berre Lagoon (France): The contribution of flood events to the matter budget. *Comptes Rendues Geoscience*, 340, 233–244.
- Gouze, E., Raimbault, P., Garcia, N., Picon, P., 2008. Nutrient dynamics and primary production in the eutrophic Berre lagoon (Mediterranean, France). *Trans. Wat. Bull.* 2, 17-40.
- Hietanen, S., Kuparinen, J., 2007. Seasonal and short-term variation in denitrification and anammox at a coastal station on the Gulf of Finland, Baltic Sea. *Hydrobio.* 596, 67-77.
- Hopkinson, C.S., Giblin, A.E., Tucker, J., Garritt, R.H., 1999. Benthic metabolism and nutrient cycling along an estuarine salinity gradient. *Est.* 22, 825–843.
- Horner-Devine, M.C., Martiny, A.C., 2008. News about nitrogen. *Sci.* 320, 757–758.
- Jäntti, H., Hietanen, S., 2012. The effects of Hypoxia on sediment nitrogen cycling in the Baltic Sea. *Ambio.* 41, 161-169.
- Jäntti, H., Stange, F., Leskinen, E., Hietanen, S., 2011. Seasonal variation in nitrification and nitrate reduction pathways in coastal sediments in Gulf of Finland, Baltic Sea. *Aqu. Microb. Ecol.* 63, 171-181.
- Jenkins, M., Kemp, W., 1984. The coupling of nitrification and denitrification in two estuarine sediments. *Limn. Ocean.* 29, 609-619.
- Jensen, K., Revsbech, N., Nielsen, N., 1993. Microscale distribution of nitrification activity in sediment determined with a shielded microsensor for nitrate. *App. Env. Microb.* 59, 3287-3296.
- Jensen, K., Sloth, N., Risgaard-Petersen, N., Rysgaard, S., Revsbech, N., 1994. Estimation of nitrification and denitrification from micorprofiles of oxygen and nitrate in model sediment systems. *App. Env. Microb.* 60, 2094-2100.
- Jickells, T. D., 1998. Nutrient biogeochemistry of the Coastal Zone. *Sci.* 281, 217–222.
- Kérouel, R., Aminot, A., 1997. Fluorometric determination of ammonia in sea and estuarine waters by direct segmented flow analysis. *Mar. Chem.* 57, 265-275.

- Kim, K.T., 1985. La salinité et la densité des eaux des étangs de Berre et de Vaïne (Méditerranée nord-occidentale). Relations avec les affluents et le milieu marin voisin. *J. Nat Sci.* 5, 221-246.
- Koroleff, F., 1970. Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. ICES Information on techniques and methods for sea analysis, an interlaboratory report 3: 19-22.
- Lane, R.R., J.W. Day, and J. Day. 2005. Marsh elevation change, accretion, and subsidence at three Louisiana coastal wetlands receiving diverted Mississippi River water. *Wetlands* (26)1130-1142.
- Laima, M.J.C., 1993. Recovery of $^{15}\text{NH}_4$ in labeling experiments on coastal marine sediments. *Mar. Chem.* 44, 31-42.
- Laverman, A.M., Canavan, R.W., Slomp, C.P., Van Cappellen, P., 2007. Potential nitrate removal in a coastal freshwater sediment (Haringvliet Lake, The Netherlands) and response to salinization. *Wat. Res.* 41, 3061-3068.
- Lohse, L., Malschaert, J.F.P., Slomp, C.P., Helder, W., Van Raaphorst, W., 1993. Nitrogen cycling in North Sea sediments: interaction of denitrification and nitrification in offshore and coastal areas. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 101, 283-296.
- Magalhaes, C.M., Joye, S.B., Moreira, R.M., Wiebe, W.J., Bordalo, A.A., 2005. Effect of salinity and inorganic nitrogen concentrations on nitrification and denitrification rates in intertidal sediments and rocky biofilms of the Douro River estuary, Portugal. *Wat. Res.* 39, 1783-1794.
- Mars, P., 1949. Contribution à l'étude biologique des étangs méditerranéens. Quelques aspects de l'évolution de l'étang de Berre. *Bulletin de la Société Linnéenne de Provence* 17, 8-16.
- Mars, P., 1966. Recherches sur quelques étangs du littoral méditerranéen français et sur leurs faunes malacologiques. *Vie et Milieu*, 20, 1-359.
- Minas, M., 1973. Synthèse et dégradation de la matière organique dans l'écosystème de l'étang de Berre, dynamique et bilan, rapport avec le régime hydrologique. Doctoral thesis, University of Aix-Marseille, France.

- Minas, M., 1974. Distribution, circulation et évolution des éléments nutritifs, en particulier du mécanisme de l'eutrophisation dans l'étang de Berre. *Annales de l'Institut Océanographique*, 52, 153-161.
- Minas, M., Bonin, M.C., Coste, B., David, P., Minas, H.J., 1976. Caractère particulier du mécanisme de l'eutrophisation dans l'étang de Berre. *Annales de l'Institut Océanographique*, 52, 153-161.
- Minjeaud, L., Bonin, P., Michotey, V.D., 2008. Nitrogen fluxes from marine sediments: quantification of the associated co-occurring bacterial processes. *Biogeochemistry*, 90, 141–157.
- Minjeaud, L., Michotey, V.D., Garcia, N., Bonin, P., 2009. Seasonal variation in di-nitrogen fluxes and associated processes (denitrification, anammox and nitrogen fixation) in sediment subject to shellfish farming influences. *Aquatic Sciences*, 71, 425–435.
- Mulholland, P.J., 2008. Stream denitrification across biomes and its response to anthropogenic nitrate loading. *Nature*, 452, 202–205.
- Nerini, D., Mante, C., Burbec, J.P., Garcia, C., 2001. Une méthode statistique de détermination de séquences caractéristiques dans une série temporelle de plusieurs variables. Application à la physico-chimie des eaux de l'étang de Berre. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 332, 457–464.
- Nielsen, K., Risgaard-Petersen, N., Somojai, B., Rysgaard, S., Bergo, T., 2001. Nitrogen and phosphorus retention estimated independently by flux measurements and dynamic modeling in the estuary, Randers Fjord, Denmark. *Marine Ecology Progress Series*, 219, 25–40.
- Nielsen, L.P., 1992. Denitrification in sediment determined from nitrogen isotope pairing. *FEMS Microbiology Ecology*, 86, 357–362.
- Nishio, T., Koike, I., Hattori, A., 1983. Estimates of denitrification and nitrification in coastal and estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 444-450.
- Nixon, S.W., 1981. Remineralization and nutrient cycling in coastal marine ecosystems. In *Nutrient enrichment in estuaries*, ed. B.N. Cronin. Clifton: Humana.
- Paerl, H. W., Dennis, R. L., Whitall, D. R., 2002. Atmospheric deposition of nitrogen: Implications for nutrient overenrichment of coastal waters. *Estuaries*, 25, 677–693.

- Rysgaard, S., Risgaard-Petersen, N., Sloth, N.P., 1996. Nitrification, denitrification, and nitrate ammonification in sediments of two coastal lagoons in Southern France. *Hydrob.* 329, 133-141.
- Rysgaard, S., Thastum, P., Dalsgaard, T., Christensen, P.B., Sloth, N.P., 1999. Effects of salinity on NH_4^+ adsorption capacity, nitrification, and denitrification in Danish estuarine sediments. *Est.* 22, 21-31.
- Schachter, D., 1954. A propos d'une pollution accidentelle de l'étang de Berre provoquée par un déversement massif d'hydrocarbures. Rapport et Procès verbaux des Réunions de la Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée, 12, 251-254.
- Schlesinger, W. H., 1997. *Biogeochemistry*, 2nd Academic Press, San Diego, California.
- Seitzinger, S. P., Kroeze, C., Bouwman, A. F., Caraco, N., Dentener, F., Styles, R. V., 2002. Global patterns of dissolved inorganic and particulate nitrogen inputs to coastal systems: Recent conditions and future projections. *Est.* 25, 640-655.
- Seitzinger, S.P., 1988. Denitrification in freshwater and coastal marine ecosystems: Ecological and geochemical significance. *Limn. Ocean.* 33, 702-724.
- Seitzinger, S.P., 2008. Nitrogen cycle out of reach. *Nat.* 425, 162-163.
- Smith, V.H., Joye, S.B., Howarth, R.W., 2006. Eutrophication of freshwater and marine ecosystems. *Limn. Ocean.* 51, 351-355.
- Stora, G., Arnoux, A., 1988. Effects on Mediterranean lagoon macrobenthos of a river diversion: assessment and analytical review in: El-Sabh M.I., Murty T.S. (Eds.). *Nat. Man-Made Haz.* 525-546.
- Stora, G., Arnoux, A., Galas, M., 1995. Time and spatial dynamic of Mediterranean lagoon macrobenthos during an exceptionally prolonged interruption of freshwater inputs. *Hydrob.* 300-301.
- Thamdrup, B., Dalsgaard, T., 2002. Production of N_2 through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. *App. Env. Microb.* 68, 1312-1318.

- Tréguer, P., Lecorre, P., 1975. Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer. Lab. Océanogr. Chim. Univ. Bretagne Occid, Brest 110p.
- Vahtera, E., Conley, D.J., Gutafsson, B.G., Kuosa, H., Pitkänen, H., Savchuk, O.P., Tamminien, T., Viitasalo, M., et al. 2007. Internal ecosystem feedbacks enhance nitrogen-fixing cyanobacteria blooms and complicate management in the Baltic Sea. *Ambio*. 36, 186-194.
- Valiela, I., Collins, G., Kremer, J., Lajtha, M., Geist, M., Seely, B., Brawley, J., Sham, C.H., 1997. Nitrogen loading from coastal watersheds to receiving estuaries: review of methods and calculation of loading to Waquoit, Bay. *Ecol. App.* 7, 358-380.
- Van de Graaf, A.A., de Bruijn, P., Robertson, L.A., Jetten, M.S.M., Kuenen, J.G., 1997. Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of ^{15}N studies in a fluidized bed reactor. *Microb.* 143, 2415–2421.
- Zehr, J.P., Kudela, R.M., 2011. Nitrogen Cycle of the Open Ocean: From Genes to Ecosystems. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 3, 197-225.
- Zillén, L., Conley, D., Andrén, T., Andrén, E., Björck, S., 2008. Past occurrences of hypoxia in the Baltic Sea and the role of climate variability, environmental change and human impact. *Ear. Sci. Rev.* 91, 77-92.

Chapitre IV
**Short-term responses of nitrogen
fluxes in the sediments of coastal
lagoon exposed to long-term
salinity fluctuations: a microcosm
study**

Chapitre IV: Short-term responses of nitrogen fluxes in the sediments of a coastal lagoon exposed to long-term *in situ* salinity fluctuations: a microcosm study

Soumis dans Marine Ecology Progress Series

Imen Zaghmouri, Valerie D. Michotey, Nicole Garcia and Patricia C. Bonin*

Aix-Marseille Université, Université du Sud Toulon-Var, CNRS/INSU, IRD, MIO, UM 110, 13288, Marseille, Cedex 09.

Address for correspondence: Bonin P., Mediterranean Institute of Oceanography (MIO) Campus de Luminy, Case 901, 13288 Marseille Cedex 9, France.

*Email: patricia.bonin@univ-amu.fr

Tel.: 33 491829336

Fax: 33 491829641

Avant propos

La connaissance des activités du cycle de l'azote, du budget d'azote inorganique dans les lagunes et des facteurs environnementaux qui contrôlent ces processus, est à la fois d'une importance fondamentale et pratique (Magalhaes et al. 2005). Les voies et les taux de réduction du nitrate dépendent principalement des concentrations en NO_3^- , en carbone organique, mais aussi de la température et de la salinité. Ces facteurs peuvent influencer les échanges des différentes formes d'azote à l'interface eau/sédiment, et par conséquent les communautés microbiennes responsables des processus du cycle de l'azote (Laverman et al. 2007). Différentes relations entre l'influence de la salinité et des concentrations en azote inorganique sur les processus sédimentaires du cycle de l'azote ont été décrites (Ogilvie et al. 1997, Rysgaard et al. 1999). Il a souvent été difficile d'expliquer les effets d'un paramètre spécifique sur les flux d'azote, puisque dans une lagune, de nombreux paramètres environnementaux et chimiques sont corrélés ou peuvent interagir. Les effets régulateurs de la salinité sur les processus du cycle de l'azote ont été étudiés dans ce chapitre. En effet, les apports accrus d'eau douce dans le bassin versant, en provenance des rivières et des pluies ont tendance à modifier le régime de salinité des lagunes.

Les conséquences écologiques suite à de tels changements, notamment une perte de la biodiversité, ont suscité un intérêt considérable depuis la dernière décennie (Loreau et al. 2001). Un stress halin peut affecter la composition des communautés microbiennes présentes, leurs potentiels d'utilisation du substrat, ainsi que la corrélation entre leur composition et leur fonction (Baho et al. 2012).

L'étude de la réponse des activités microbiennes (résistance, résilience, shift) face à une perturbation liée aux fluctuations de la salinité a été mise en évidence dans des milieux contrôlés (microcosmes). L'estimation des différents processus du cycle de l'azote a été établie à partir des sédiments de l'étang de Berre provenant d'une station nord (caractérisée par des fréquentes fluctuations de la salinité) et d'une station sud (caractérisée par des fluctuations moins fréquentes de la salinité).

Ce chapitre se focalise sur la sensibilité des activités du cycle de l'azote soumises à différents scénarios de fluctuations de salinité. L'historique de la salinité de chaque sédiment, la structure et la composition en plus de la variation de la salinité vont nous permettre d'expliquer la réponse de chaque activité face au stress.

1. Abstract

The sensitivity of nitrogen processes to salinity fluctuations was studied in microcosms subject to short-term salinity changes. Microcosms were filled with Berre lagoon sediments from two stations, SA1 and SA3, that differ in the pattern of long term stresses. Since 1966, frequent salinity changes have been recorded in SA1, whereas less frequent changes have been recorded in SA3. In our study, only salinity was changed. The other parameters of the microcosm were held constant to specifically examine the sensitivity of the nitrogen processes to salinity fluctuations. Anammox and dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) were insignificant. For this reason, only denitrification, nitrate reduction and net nitrification rates were measured throughout the experiment. Overall, denitrification and nitrate reduction exhibited the same pattern of response when salinity fluctuations occurred and showed higher resilience than did nitrification. In addition, this microcosm approach showed that the rates for SA3 were higher than those for SA1 and that the SA3 sediment produced a stronger resistance to salinity fluctuations than the SA1 sediment.

Keywords: salinity fluctuations, microcosm, denitrification, nitrification, nitrate reduction, resilience, change

2. Introduction

Coastal ecosystems are subject to continuous environmental changes, such as those involving salinity or nutrient concentrations. These variable conditions have a very important impact on microbial communities, which must tolerate rapid and repeated fluctuations to maintain their ability to function (Baho et al. 2012; Castel et al. 1996). Most Mediterranean lagoons exhibit spatiotemporal variations in salinity. Depending on local conditions, these variations can range from completely fresh to marine salinity levels (Kjerfve, 1986, 1996). Variation in salinity imposes considerable osmotic and matric stress on microorganisms and can cause decreases or increases in cytoplasmic volume; damage to membranes, proteins and nucleic acids; and cellular lysis. In shallow zones, most of these microorganisms are involved in biogeochemical cycling and processes in the sediment and the water column. Nitrogen cycling in these areas is of particular interest because it regulates the amount of nitrogen available for phytoplankton (Bonin et al. 1998; Bonin, 2000; Seitzinger, 1990) and plays a crucial role in the dynamics and eutrophication of these ecosystems (Gardner et al. 2006; Ogilvie et al. 1997; Pennock et al. 1999; Rysgaard et al. 1999; Twilley et al. 1999). The literature indicates that the effects of salinity changes on nitrogen activity are site specific. Indeed, contradictory tendencies have been reported. For denitrification, no effects have been found for several different coastal or estuarine areas (Fear et al. 2005, Nielsen et al. 2001, Magalhaes et al. 2005), whereas other studies have shown an inverse relationship between denitrification rates and salinity (Rysgaard et al, 1999; Giblin et al. 2010). Nitrification has been reported to be stimulated (Magalhaes et al. 2005) or inhibited (Campos et al. 2002; Rysgaard et al. 1999; Bernhard et al. 2007) by increases in salinity. Giblin et al. (2010) showed that DNRA was highly correlated with salinity. However, it is

difficult to assess the direct impact of salinity changes in field studies because many environmental and chemical parameters are correlated or interact at sampling sites (Jackson et al. 2009). Only a few experimental studies (e.g., Laverman et al. 2007) address the resistance and resilience of microbial sediment communities in the face of perturbations.

In the present study, we used a microcosm approach to specifically examine the effects of short-term salinity variations on microbial activities. The sediments selected for study originated from the brackish semi-enclosed Berre lagoon (SE France), which offers a particular historical record of salinity. This lagoon receives large amounts of freshwater and nutrients from its natural tributaries, the Arc and the Touloubre Rivers, located to the north of the lagoon. Since 1966, additional high freshwater inputs were introduced in a fluctuating mode by the hydroelectric power plant located at Saint-Chamas (at the northern part of the lagoon). These inputs did not originally belong to the watershed of this lagoon but correspond to deviation of water from Durance River. Since then, large and uncontrolled volumes of freshwater were introduced into the lagoon, reaching up to $6.630\ 10^9\ \text{m}^3\cdot\text{y}^{-1}$ (seven times the lagoon's volume). Due to the Mediterranean climate, the river flows fluctuate sharply (the weekly flows for the Arc River range from 79 to $5\ \text{m}^3\cdot\text{s}^{-1}$; (Delpy et al. 2012a)). These salinity fluctuation together with silt input by Durance River and the uncontrolled anthropogenic activities in the surrounding areas of the lagoon led to a very strong eutrophication and hypoxia in the bottom water which raised environmental problems and social protests (Gouze et al. 2008b). Since 1994, progressive measures have been taken to limit the freshwater inputs and to control their periodicity and fluctuations in the lagoon (Gouze et al. 2008a, Gouze et al. 2008b). Before new restrictions on the power plant loads went into effect in 2005, the freshwater inputs varied substantially and could range from $0\text{-}270\ \text{m}^3\cdot\text{s}^{-1}$ from day to

day. For this reason, the salinity also varied and could range from 15 to 20 within one-half day (Nerini et al. 2001). After 2005-2006, the flows were more nearly constant and fluctuated between 80 and 2 m.s⁻¹ from week to week (Delpy et al. 2012). The salinity throughout the lagoon still ranges between 15 and 35. The power plant releases remain the main source of water for the lagoon, with almost 1.3 times the lagoon's volume (GIPREB, 2011).

The microcosm experiment in the present study aimed to analyse the response of N cycling activities towards salinity fluctuation. It was conducted with two sediments that differ in the pattern of long term stress. The first sediment sample was collected at station SA1, located in the northern part of the lagoon and directly influenced by freshwater inputs. The second sample was collected at station SA3, located in the southern part of the lagoon in front of the Caronte channel leading to the Sea and was under marine influence. Different scenarios for salinity variations were tested, and activities related to the nitrogen cycle (nitrate reduction, denitrification, anammox, dissimilative nitrate reduction to ammonium (DNRA) and net nitrification (Nw)) were measured.

3. Materials and methods

3.1 Sampling sites

The two sampling stations (Fig. IV.1) were distinguished by their contrasting salinity patterns. The first station (SA1, ~ 6 m deep) is located in the northern part of the lagoon in front of the power plant and the Arc and Touloubre River mouths and is subject to freshwater loads. Its annual salinity ranges between 15 and 25. The second station (SA3, ~ 9 m deep) is located in the southern part of the lagoon beyond the Caronte channel, which connects the lagoon to the Mediterranean Sea. Station SA3 is under marine influence; its annual salinity ranges from 20 to 35 (Zaghmouri et al. 2013).

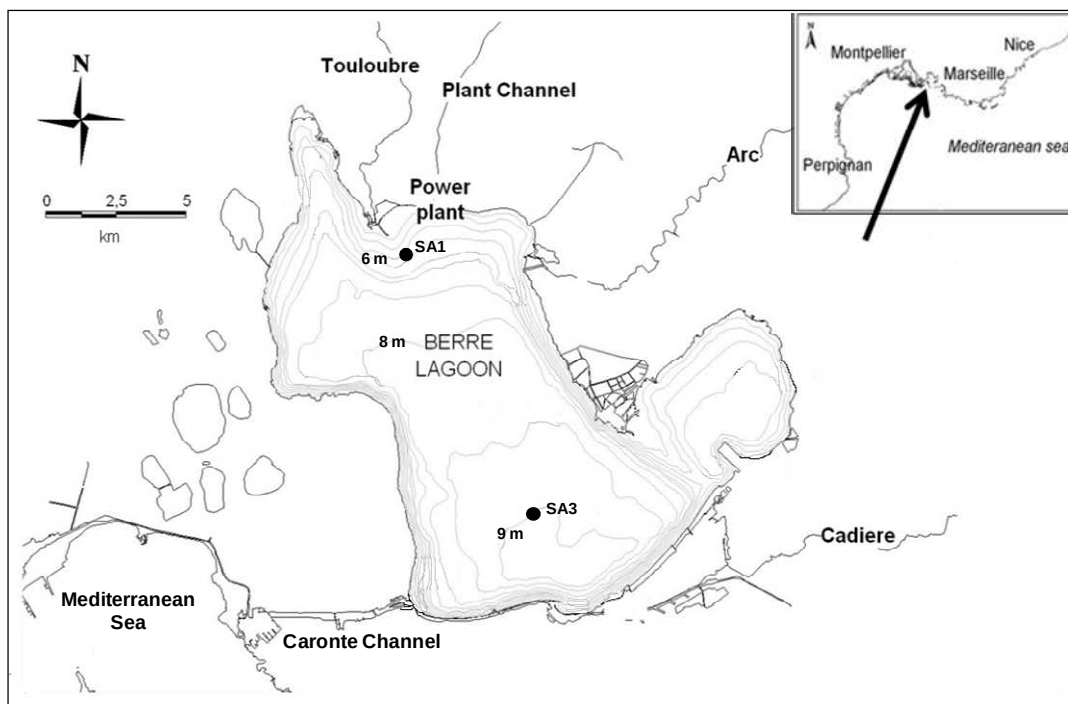


Fig. IV. 1 Location of Berre lagoon and sampling stations.

3.1.1 Sample collection

The sediments used in the experiment were collected in December 2010 at station SA3 (with an *in situ* salinity of 33 and an *in situ* temperature of 15.9°C) and in March 2011 at station SA1 (with an *in situ* salinity of 24 and an *in situ* temperature of 14.6°C). The sediments were rich in mud and thus characterized by a low permeability. For each station, a set of 5 PVC cores (25 cm length, 10 cm inner diameter) was used for sampling. The bottom half of the cores was filled with sediment (12 cm length). The top half was filled with *in situ* bottom water and aerated to prevent the establishment of anoxic conditions during transportation.

3.1.2 Description of microcosms

The microcosms consisted of cylinders 10 cm in diameter and 25 cm in height with a total volume of approximately 2 L (Fig. IV.2). The microcosms were filled with undisturbed sediment from the cores to a height of 12 cm and were fully re-filled with synthetic seawater (SSW, containing 22.32 g.L⁻¹ of MgSO₄·7H₂O, 0.9 g.L⁻¹ of KCl and 7.26 g.L⁻¹ of TRIS and NaCl to reach the desired salinity) and hermetically closed to the atmosphere so that no gaseous headspace remained. The individual microcosms for each sampling site corresponded to the 5 PVC sampling cores and were numbered M1 through M5. Each microcosm was equipped with an inflow device (0.3 cm inner diameter), extending into the water column and ending 1 cm above the surface sediment, through which the flowing medium entered the system. During the incubation, the water column in each microcosm was mixed using a magnetic stirrer driven by an external magnet (30 r.p.m.). Mixing tests prior to the experiment showed complete

mixing within the water portion of the microcosms. The outflow device was located on the opposite side and extended 1 cm above the surface sediment. Water was pumped via a peristaltic pump from the 5 L reservoir to the individual microcosms at a flow rate of 0.09 L.h^{-1} , creating a residence time of approximately 10.5 h in each microcosm. The reservoirs were open and provided with a stream of air bubbles to prevent N_2 accumulation and to maintain air saturation in the water phase. The microcosms were stabilised at *in situ* seawater salinity for 72 h to reach a steady state (i.e., constant N-NO_3^- and N-NH_4^+ uptake rates) before beginning the experiment.

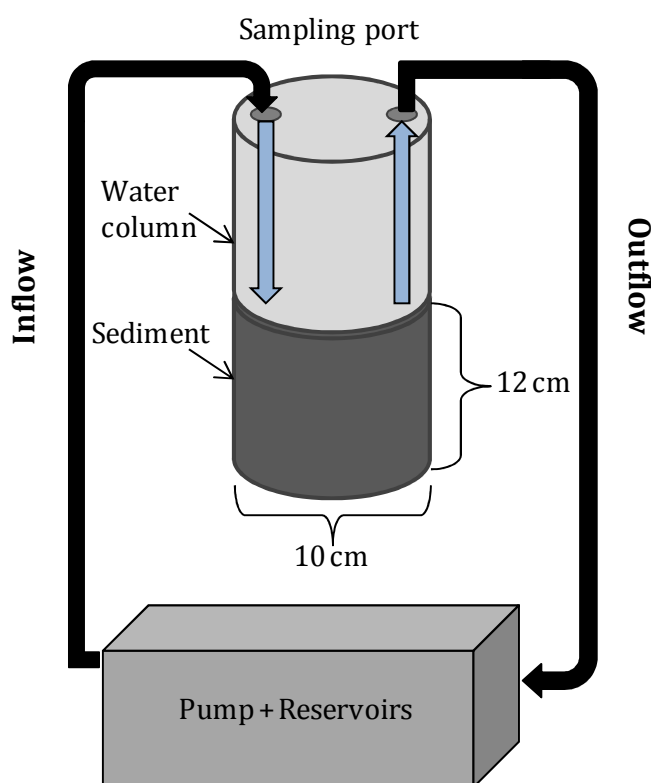


Fig. IV.2 Schematic of one microcosm chamber setup. Each microcosm was connected to a peristaltic pump and to a reservoir.

3.1.3 Microcosm experiment

In each reservoir, salinity was measured by refractometry. The salinity of the synthetic seawater (SSW) was adjusted by adding NaCl. The $\text{Na}^{15}\text{NO}_3^-$ and $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ concentrations in the reservoirs were adjusted to 250 μM and $\sim 5 \mu\text{M}$, respectively. The SSW in each microcosm reservoir was renewed at the beginning of each salinity fluctuation phase. The microcosms were incubated at the *in situ* temperature.

To assess the impact of salinity variations on the nitrogen cycle, various scenarios of salinity fluctuations mimicking those recorded in the lagoon were performed (Fig. IV.3).

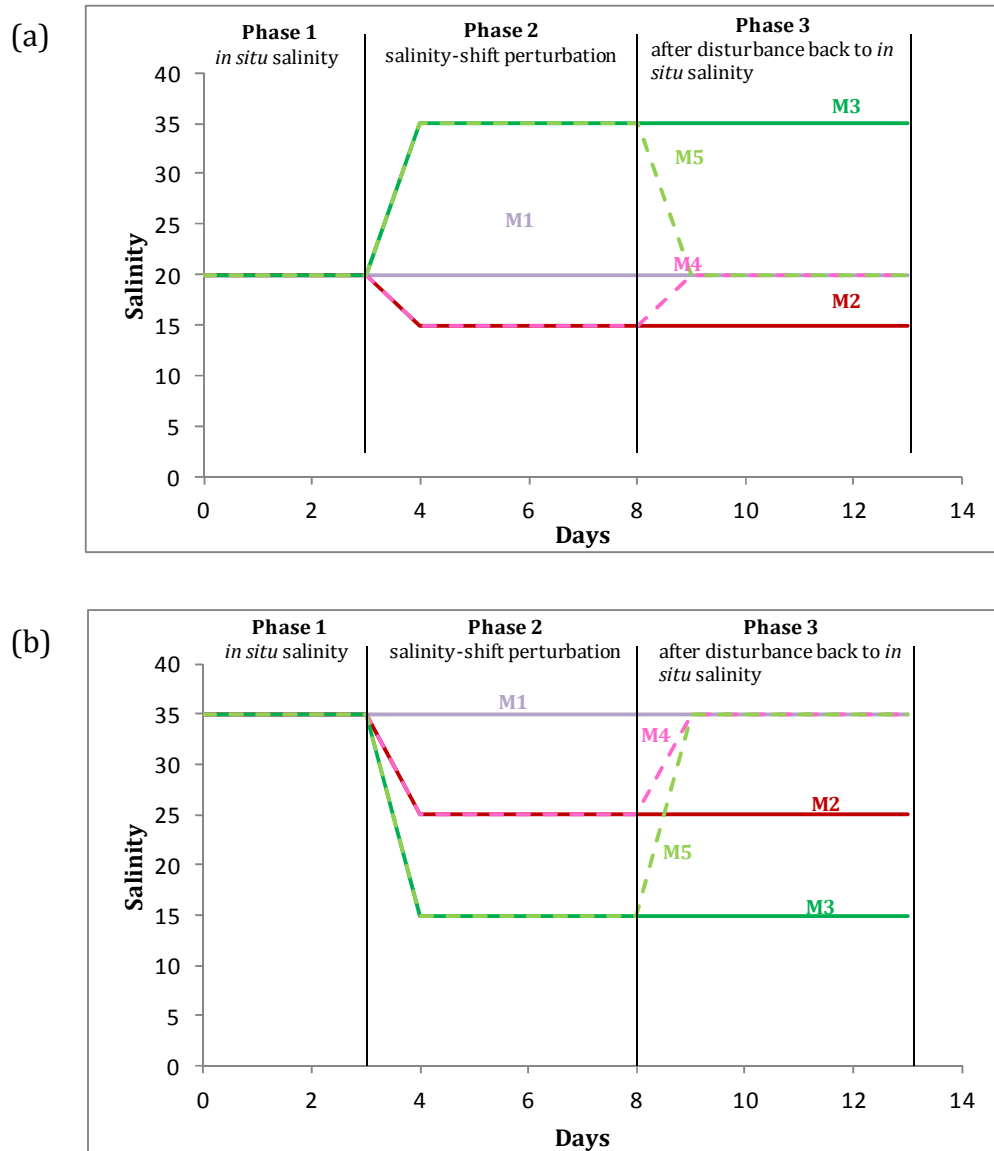


Fig. IV. 3 Summary diagrams of salinity fluctuation scenarios in the SA1 sediment (collected in March 2011) (a) and SA3 sediment (collected in December 2010) (b).

Phase 1 (in situ salinity phase) includes five independent replicates of each station microcosms were maintained to the *in situ* salinity ($S=20$ for SA1 and $S=35$ for SA3).

Phase 2 (salinity-shift perturbation phase) 4 microcosms out of the 5 used in each station were shifted (M1 remained at *in situ* salinity as a control), the M2 and M4 microcosms were subjected to a salinity decrease ($S=15$ for SA1 and $S=25$ for SA3), The M3 and M5 microcosms were subjected to the most extreme salinity values recorded in the lagoon during the last 20 years (35 for SA1 and 15 for SA3).

Phase 3 (after disturbance back to *in situ* salinity phase) 2 microcosms out of the 4 treatments were shifted back to *in situ* salinity. M2 and M3 microcosms were maintained at the same salinity as in phase 2. M4 and M5 microcosms were back to the initial *in situ* salinities after disturbance.

For both sediment types, the M1 microcosms served as controls and were maintained close to the *in situ* salinity throughout the experiment. During the 1st phase (3 days), five replicates of each station microcosms were maintained to the *in situ* salinity in order to stabilise the system (S=20 for SA1 and S=35 for SA3). During the 2nd phase (~0.5 days of transition plus 4.5 days of stability), 4 microcosms out of the 5 used in each station were shifted. Indeed, except for M1 microcosms which were still at *in situ* salinity, duplicates of microcosms were subjected to 2 kinds of salinity-shift perturbation: the M2 and M4 microcosms were subjected to a salinity decrease (S=15 for SA1 and S=25 for SA3), whereas two others (M3 and M5) were subjected to the most extreme salinity values recorded in the lagoon during the last 20 years (35 for SA1 and 15 for SA3, GIPREB, 2011). During the 3rd phase (~0.5 days of transition plus 4.5 days of stability), 2 microcosms out of the 4 treatments were shifted back to *in situ* salinity. Indeed, regardless of the sediment, the M2 and M3 microcosms were maintained at the same salinity as in phase 2, whereas the M4 and M5 microcosms were back to the initial *in situ* salinities after disturbance.

3.2 Microbial activities

To quantify 5 processes associated with the nitrogen cycle (nitrate reduction, Nw, denitrification, anammox and DNRA), the rates of substrate consumption or product accumulation were measured. For each microcosm during a given phase and for each activity, rates were calculated as the mean of at least 6 individual measurements, determined independently each day within 10 h interval during the steady state of each phase. Water was collected in vacuum Venoject® (Venoject Terumo, Japan) headspaces twice a day (10h interval) at the inlet and outlet of each microcosm. Concentration of

nutrients (NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^-) dissolved gases (N_2) and their isotopic composition were measured in each sample.

3.2.1 Denitrification and anammox rates

For the measurement of denitrification and anammox, Venoject® (Venoject Terumo, Japan) headspaces from each microcosm were injected into a mass spectrometer to determine N_2 concentrations (Anagaz 100 Quadruple mass spectrometer, MKS, England). The concentrations of $^{29}\text{N}_2$ and $^{30}\text{N}_2$ were measured in addition to $^{28}\text{N}_2$, Ar and O_2 (Minjeaud et al. 2008). At each sampling time, the denitrification and anammox rates were calculated with the comprehensive method outlined by Spott & Stange (2007). This approach allows for the calculation of the contribution of denitrification and anammox to an N_2 mixture and includes considerations of possible contamination by atmospheric N_2 . The following calculations (Eqs. 1-3) were used to determine the portion of atmosphere (A), denitrification (B) and anammox (C) contributing to the N_2 mixture:

$$A = \frac{2b(\alpha_{30}-cd)+(c+d)(b^2-\alpha_{30})-(b^2-cd)(\alpha_{29}+2\alpha_{30})}{(a-b)[2(ab+cd)-(a+b)(c+d)]} \quad \text{Eq. 1}$$

$$B = \frac{2a(cd-\alpha_{30})+(c+d)(\alpha_{30}-\alpha^2)+(\alpha^2-cd)(\alpha_{29}+2\alpha_{30})}{(a-b)[2(ab+cd)-(a+b)(c+d)]} \quad \text{Eq. 2}$$

$$C = \frac{2ab-\alpha_{29}(a+b)+2\alpha_{30}(1-b-a)}{2(ab+cd)-(a+b)(c+d)}, \quad \text{Eq.3}$$

Where α_{28} , α_{29} and α_{30} are the molar fractions of masses 28, 29, and 30, respectively, within the N_2 mixture and a, b, c and d are the ^{15}N atom fractions of N_2 (a), NO_3^- (b), NO_2^- (c) and NH_4^+ (d), respectively.

3.2.2 DNRA and Nw rates

Nitrate and nitrite concentrations in the overlying water column were analysed with a Technicon-Auto-Analyser according to Treguer and Le Corre (1975). Ammonium concentrations were determined using the fluorometric method (Kérouel and Aminot 1997).

The isotopic composition of $\text{N-NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ and N-NH_4^+ was determined according to Bonin et al. (1998). Ammonium was extracted from each sample by microdiffusion at 60  C after treatment with a mid-alkali (MgO) to convert NH_4^+ to NH_3 (Brooks et al. 1989). Ammonia was trapped on acidified (25   l, 0.5 N H_2SO_4), precombusted Whatman GF/C filters, and the ^{15}N content was analysed by mass spectrometry (Tracer Mass, European Scientific) (Bonin 1996). The rates of DNRA were calculated as previously described (Gilbert et al. 1997).

$$DNRA = \frac{(AT\% \text{ NH}_4^+)([\text{NH}_4^+])}{(AT\% \text{ enrichment NO}_3^-)(\text{Time})} , \quad \text{Eq. 4}$$

Where $AT\% \text{ NH}_4^+$ and $AT\% \text{ NO}_3^-$ are the molar fractions of $^{15}\text{N-NH}_4^+$ and $^{15}\text{NO}_3^-$ respectively.

After 2 successive extractions of $^{14}\text{NH}_4^+$ by microdiffusion, the remaining $^{14,15}\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$ in the microdiffusion flask was reduced chemically to ammonium with Devarda's alloy and subsequently microdiffused (Brooks et al. 1989). The rate of nitrification released as NO_3^- to the overlying water (net nitrification, Nw) was measured based on the isotopic dilution of ^{15}N labelling of NO_3^- in the overlying water during time (adapted from Koike

and Hattori 1978; Nishio et al. 1983) according to the equation developed by Glibert et al. (1982):

$$N_w = \left(\frac{\ln (At\% {}^{15}\text{NO}_3\text{in})}{\ln (At\% {}^{15}\text{NO}_3\text{out})} \right) * \left(\frac{Ms * S}{Rt} \right)$$

Where $At\% {}^{15}\text{NO}_3\text{in}$ is the % of input enrichment in NO_3^- , $At\% {}^{15}\text{NO}_3\text{out}$ is the % of output enrichment in NO_3^- , Ms is the concentration of nitrogen in the sample (μM), S is the surface area of the microcosm (cm^2) and Rt is the residence time in the microcosm (h).

3.2.3 Nitrate reduction rates

Nitrate reduction rates (NaR) were calculated by combining denitrification and DNRA rates ($\text{NaR} = \text{D}_{\text{tot}} + \text{DNRA}$) (Dong et al. 2009, Jäntti et al. 2011).

3.3 Statistical analysis

Student's t test was used to examine the influence of salinity changes on nitrogen processes. The significance level for all tests was set at $p < 0.05$. All tests were performed with the XLSTAT® (XLSTAT software® 2008, Addinsoft, Paris).

A repeated measures-Hierarchical analyses of variance analysis (rm-ANOVA) was used to examine the variance in the nitrogen processes within microcosms along a time series. In fact, as there are five different salinity treatments, each of which has a specific sequence of salinity shifts in time, and as the experiment is a time-series with three dependant phases, the use of rm-ANOVA is the most appropriate in this study.

The significance level for all tests was set at $p < 0.05$. All tests were performed with XLSTAT® (XLSTAT software® 2008, Addinsoft, Paris).

4. Results

During the first phase (*in situ* salinity phase), 5 microcosms of each sampling sites were incubated at their *in situ* salinity (20 and 35 for SA1 and SA3, respectively). For each sampling site, there was no difference in the initial activities among the 5 microcosms (rm-ANOVA, $p > 0.05$) during the 1st phase (Fig. IV.4, Fig. IV.5). The DNRA rates never exceeded $6 \text{ nmol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ and $9.25 \cdot 10^{-2} \text{ nmol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ in SA1 and SA3, respectively. Furthermore, the maximum anammox rates reached only $7.2 \text{ nmol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ and $8.6 \text{ nmol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ in SA1 and SA3, respectively (data not shown). Because the rates of the other activities (NaR, denitrification, and Nw) were in the micromolar range, DNRA and anammox were considered negligible in this study. The extreme low DNRA and anammox imply that the bulk of nitrate reduction is attributed to denitrification. Differences of magnitude between the stations were found in NaR, denitrification, and Nw, (NaR rates: $0.88 \pm 0.16 \text{ } \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ in SA1 vs. $8.26 \pm 1.32 \text{ } \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ in SA3; denitrification rates: $0.86 \pm 0.15 \text{ } \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ in SA1 vs. $8.25 \pm 1.23 \text{ } \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ in SA3; and Nw rates: $0.47 \pm 0.1 \text{ } \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ in SA1 vs. $1.55 \pm 0.29 \text{ } \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ in SA3; Fig. IV.4, Fig. IV.5) with significant lower rates at SA1 than at SA3 (t test, $n=12$, $p < 0.05$ for each activity).

During the 2nd phase (salinity-shift perturbation phase), a salinity fluctuation (increase or decrease) was applied to the microcosms except for the control microcosms (M1) that remained at the same salinity. Whatever the station, for all nitrogen activities, no rate differences were observed between phase 1 and phase 2 (t test, $n=12$, $p > 0.05$).

In the SA1 microcosms (Fig. IV.4), $1.07 \pm 0.49 \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ for NaR and $1.04 \pm 0.49 \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ for denitrification. During this phase, similar NaR rates were measured in the microcosms with similar treatments. These rates reached $1.72 \pm 0.38 \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ and $1.42 \pm 0.24 \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ for M2/M4 ($\Delta S = -5$) and M3/M5 ($\Delta S = +15$), respectively (Fig. IV.4a). The denitrification rates reached the same level as NaR and followed the same trend (Fig. IV.4b). A significant increase in NaR and denitrification was observed when salinity decreases ($\Delta S = -5$) in two microcosms (M2 and M4) in comparison with M1 control during phase 2 (rm-ANOVA, $p = 0.018 < 0.05$). However, in both microcosms where salinity increases (M3 and M5, $\Delta S = +15$), no significant change in activities was observed (rm-ANOVA, $p = 0.116 > 0.05$). For Nw, changing salinities during the 2nd phase were not associated with any consistent change in rates in SA1 (rm-ANOVA, $p > 0.05$), with $0.47 \pm 0.28 \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ in M2/M4 ($\Delta S = -5$) and $0.32 \pm 0.13 \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ in M3/M5 ($\Delta S = +15$), in comparison with $0.2 \pm 0.06 \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ observed in the control M1 (Fig. IV.4c).

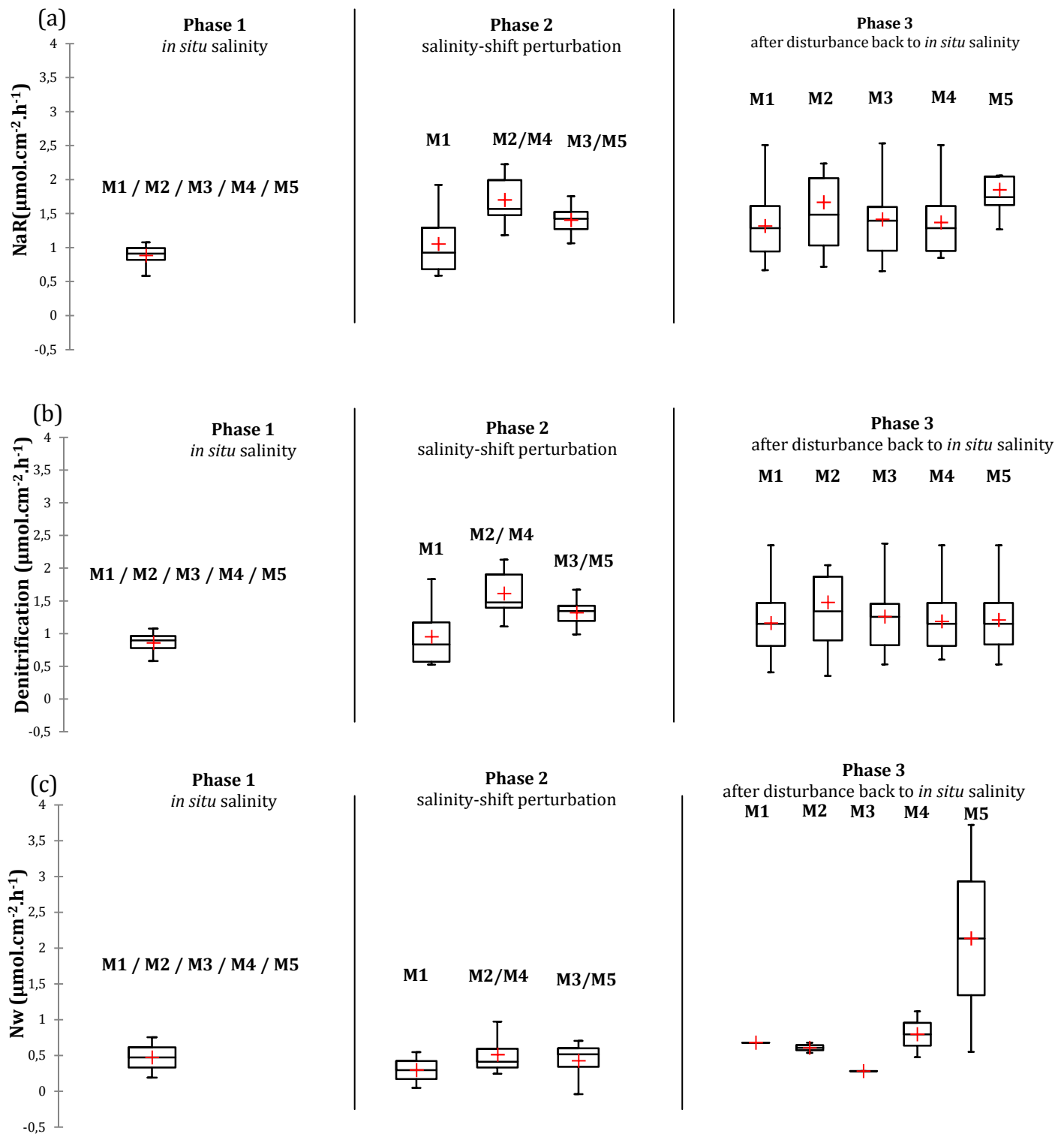


Fig. IV. 4 Variations in Nitrate Reduction (NaR) ($\mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$) (a), denitrification ($\mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$) (b) and net nitrification (Nw) ($\mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$) (c) rates during the 3 incubation phases in SA1. Box-plots represent multiple sampling in each microcosm. During Phase 1, the five independent replicates were at *in situ* salinity during 3 days, n=12 samples were used to build a box-plot per microcosm. Every day and for each microcosm, 4 samples were collected at 10h interval.

During Phase 2, two independent duplicates ((M2, M4) and (M3, M5)) were shifted, while M1 remained at *in situ* salinity as controls. Each box plot was built using n=20 samples. Every day and for each microcosm, 4 samples were collected at 10h interval.

During Phase 3, two of the 4 treatments (M4 and M5) returned back to *in situ* salinity after the disturbance, while M2 and M3 were kept at the same salinity as in Phase 2. As for Phase 2, each box plot was built using n=20 samples. Every day and for each microcosm, 4 samples were collected at 10h interval.

Box plot: the center vertical line marks the median, the edges of the box mark first and third quartiles and the vertical lines indicate the range of values that fall within 1.5 (midrange) of the hinges, the cross marks the mean value.

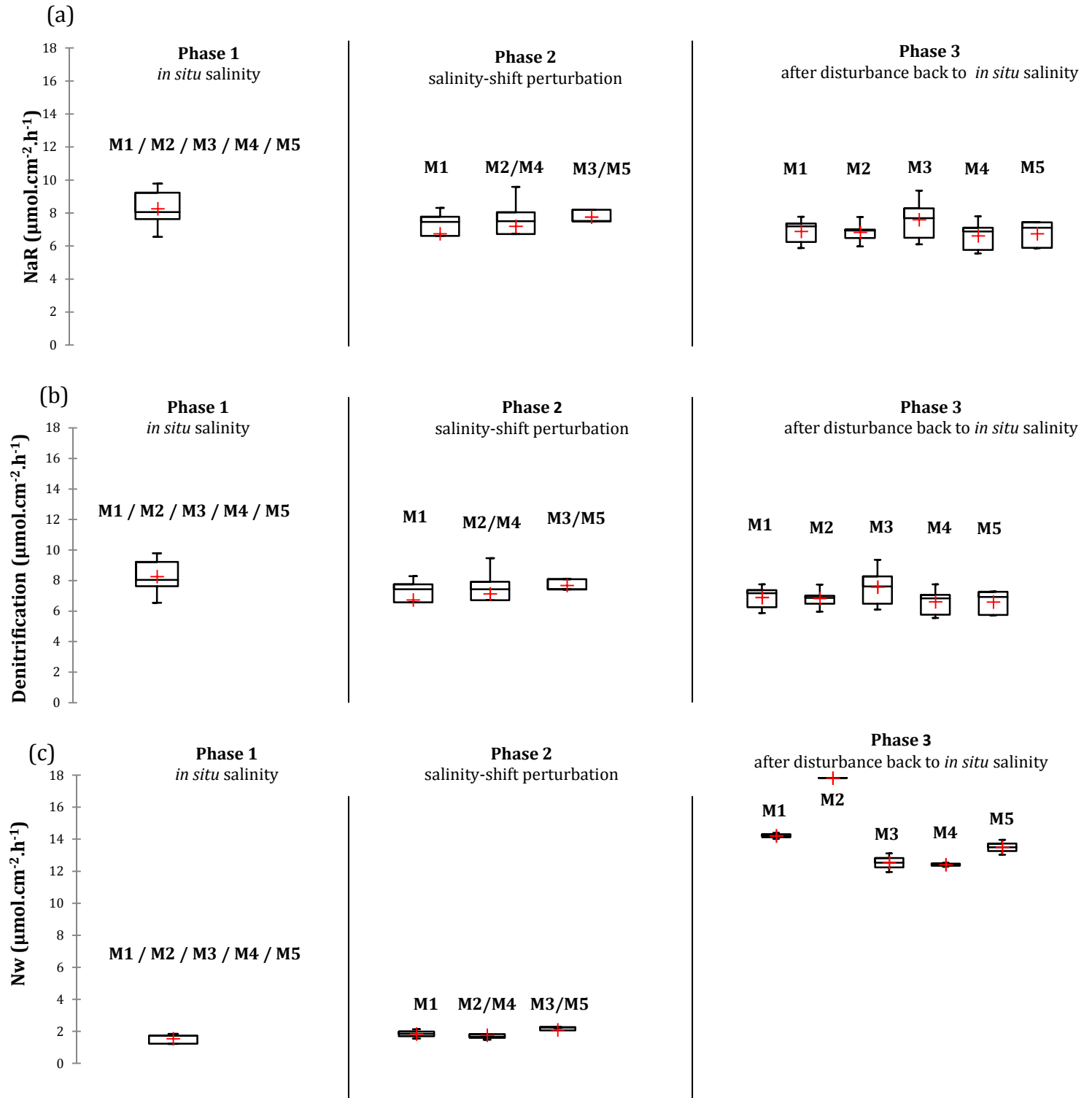


Fig. IV. 5 Variations in Nitrate Reduction (NaR) ($\mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$) (a), denitrification ($\mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$) (b) and net nitrification (Nw) ($\mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$) (c) during the 3 incubation phases in SA3. Box-plots represent multiple sampling in each microcosm. During Phase 1, the five independent replicates were at *in situ* salinity during 3 days, n=12 samples were used to build the box-plot. Every day and for each microcosm, 4 samples were collected at 10h interval.

During Phase 2, two independent duplicates ((M2, M4) and (M3, M5)) were shifted, while M1 remained at *in situ* salinity as controls. Each box plot was built using n=20 samples. Every day and for each microcosm, 4 samples were collected at 10h interval.

During Phase 3, two of the 4 treatments (M4 and M5) returned back to *in situ* salinity after the disturbance, while M2 and M3 were kept at the same salinity as in Phase 2. As for Phase 2, each box plot was built using n=20 samples. Every day and for each microcosm, 4 samples were collected at 10h interval.

Box plot: the center vertical line marks the median, the edges of the box mark first and third quartiles and the vertical lines indicate the range of values that fall within 1.5 (midrange) of the hinges, the cross marks the mean value (n=192 for each parameter of every station).

In SA3 during the 2nd phase (salinity-shift perturbation phase) and in contrast to SA1, the NaR and denitrification rates did not vary significantly in any microcosm (rm-ANOVA, $p>0.05$) compared with M1 ($6.75\pm1.87 \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$), whatever the saline stress, whether in M2/M4 ($\Delta S = -10$) ($7.14\pm1.99 \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ for denitrification and $7.2\pm2.00 \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ for NaR) or in M3/M5 ($\Delta S = -20$) ($7.70\pm1.94 \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ for denitrification and $7.76\pm1.97 \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ for NaR) (Fig. IV.5a, IV.5b). As observed for SA1, if the salinity fluctuated, the Nw rates did not change (rm-ANOVA, $p>0.05$) in the M2/M4 microcosms ($\Delta S = -10$) ($0.77\pm0.33 \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$) or in M3/M5 ($\Delta S = -20$) ($1.12\pm0.30 \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$) compared with the control M1 ($0.85\pm0.44 \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$) (Fig. IV. 5c).

During the 3rd phase (maintained disturbance or back to *in situ* salinity phase), the M4 and M5 microcosms returned to their initial salinity levels, whereas the M2 and M3 microcosms remained at the same salinity established in phase 2.

For SA1, the rates in the control M1 were similar during the 3rd phase and during the previous two phases (t test, $n=18$, $p>0.05$). The NaR rates in the M1/M2/M3/M4/M5 microcosms did not differ significantly during the 3rd phase and never exceeded $1.87\pm0.57 \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$. The same tendency was observed for denitrification activity,

with mean rates reaching $1.61 \pm 0.55 \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$. For nitrification, the trend differed. The microcosms were found to form two groups, with the M1/M2/M3/M4 microcosms presenting similar Nw rates (t test, $p > 0.05$) with mean value of $(0.79 \pm 0.32 \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1})$ (Fig IV.4c), while a significant increase in activity ($2.93 \pm 0.87 \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$) observed for M5 (rm-ANOVA, $p = 0.007 < 0.05$) which experienced two large salinity fluctuations with $\Delta S = +15$ (Fig. IV.4c).

The activity rates were still higher in SA3 than in SA1 during the 3rd phase. The rates of denitrification and NaR in the control M1 were similar during the 3rd phase (P3) and during the previous two phases (P1, P2) (t test, $n = 18$, $p > 0.05$). Whatever the salinity scenario, the NaR rates of the M1/M2/M3/M4/M5 microcosms did not differ significantly (rm-ANOVA, $p > 0.05$), ranging between 6.6 ± 0.94 and $7.6 \pm 1.32 \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$. The same tendency was observed for denitrification activity (rm-ANOVA, $p > 0.05$), with rates ranging between 6.56 ± 0.46 and $7.56 \pm 1.19 \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$. For nitrifying activity, the M1 microcosm Nw rate was not stable in time and increased substantially, from $1.55 \pm 0.29 \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ (in P1-P2) to $13.87 \pm 0.28 \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ (in P3), showing a strong microcosm effect (Fig. IV.5c; rm-ANOVA, $p = 0.001, 0.015, 0.031, 0.009, 0.028 < 0.05$ for M1, M2, M3, M4 and M5, respectively). Whatever the salinity treatment, significant modifications of the Nw rates were observed in the M2/M3/M4/M5 microcosms (Fig. IV.5c). The M2 microcosm that experienced lower desalinisation ($\Delta S = -15$) during P2 and remained at the same salinity (25) during P3 exhibited the highest Nw rate ($22.13 \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$) compared to M1 (rm-ANOVA, $p = 0.012 < 0.05$). For the other scenarios, with either a stronger desalinisation during P2 ($\Delta S = -20$, in M3 and M5) or with two successive fluctuations (M4), the nitrification rates were lower than in the control (rm-ANOVA, $p = 0.009, 0.001, 0.007 < 0.05$ for M3, M4 and M5, respectively, in comparison to M1).

5. Discussion

Salinity was shown to be a factor influencing the variability of the nitrogen rates (Gu et al. 2012). Salinity changes may generate a change in sulfide levels in sediments leading to the inhibition of nitrifying bacteria by sulfide. As a consequence, denitrification activity may decrease with the increase of nitrate supply and DNRA may be favoured to denitrification in low nitrate level environment. The rise of sulfide concentrations may also slow or stop anammox. All these consequences result in more N being conserved in the estuary and less being converted to N₂ gas and an increase in eutrophication (Thamdrup & Dalsgaard 2002, Howarth et al. 2011).

Our data confirm the complexity of the response of the processes to salinity changes. Different trends have been reported in the literature. No impacts of salinity changes on denitrification have been reported (Nielsen et al. 2001, Fear et al. 2005, Magalhaes et al. 2005, Laverman et al. 2007). A similar tendency was observed in our study in all phases for SA3 and in phase 3 for SA1. However, other studies reported an inverse relationship between denitrification and salinity (Rysgaard et al. 1999, Giblin et al. 2010), as observed for the M2/M4 microcosms of SA1 compared with M1 during salinity shift-perturbance (phase 2). Nitrate reduction (NaR) was shown to be stimulated by increased salinity (Laverman et al. 2007), as found for M3/M5 of SA1 compared with M1 during phase 2. However, this tendency cannot be generalised to all of the cases examined in our study. Several authors (Rysgaard et al. 1999, Campos et al. 2002, Bernhard et al. 2007b) reported an inverse relationship between nitrification rates and salinity, as observed for SA3 for $\Delta S=+10$ (comparison between M2 and M4 during phase 3) and for SA1 (comparison between M5 and M3 during phase 3). In contrast, Magalhaes et al. (2005) reported an increase in nitrification rates with salinity, as

observed in our study for SA3 with $\Delta S=+20$ (comparison between M3 and M5 during phase 3).

Most previously published data result from *in situ* field studies in which changes in salinity were usually accompanied by simultaneous changes in many other parameters as well (such as nitrate and the organic matter content of the sediment). In our study, the impact of salinity was tested experimentally to overcome this drawback. We assessed the sensitivity of the nitrogen processes to short-term salinity changes in samples of two sediments from the same area (Berre Lagoon) exhibiting similar physical and chemical parameters (inorganic nitrogen concentrations, %LOI) but presenting different historical patterns of salinity fluctuations. Before 1966, the entire lagoon was under marine influence. Between 1966 and 2005, large salinity fluctuations (ranging from 7 to 35) occurred throughout the lagoon. Since 2005-2006, due to the freshwater loading restrictions, the situation has improved, and desalinisation has been observed primarily in the northern part of the lagoon (SA1). The typical extreme salinity values recorded in the Berre lagoon (15 and 35) were tested in our microcosms.

Lagoons are complex, adaptive systems that are characterised by historical dependency, nonlinear dynamics, threshold effects, multiple basins of attractors and limited predictability (Levin 2001, Folke et al. 2004). The dynamics of ecosystems always fluctuate, but some perturbations are larger than others. The perturbations may be a result of extrinsic forcing (e.g., salinity changes), internal factors (e.g., community changes) or a combination of causes (Carpenter et al. 2002). If a disturbance occurs, an ecosystem can respond differently: (1) If the disturbance is low, then the system may resist the change. Resistance is the intensity at which a system can be disturbed from its reference state without the change being essentially irreversible (Levin 2001, Levin & Lubchenco 2008). (2) If the disturbance is greater and limited in time, the system can

show resilience, i.e., once the disturbance has stopped with a certain rate it can return to its initial state in term of functioning. This requires sometime reorganisation involving species whose metabolic capacities confer redundancy (Holling 1973, Folke et al. 2004, Walker et al. 2004). (3) If the disturbance becomes more frequent or more severe, the ecosystem can partially recover (Palumbi et al. 2008) or can undergo profound changes, shifting to an alternative state (regime shift) (Folke et al. 2004, Palumbi et al. 2008).

The balance between disturbance rates and recovery has long been known to be important in the maintenance of community structure and, therefore, in the maintenance of the associated processes and cycles (Palumbi et al. 2008).

The initial phases of this experimental procedure allowed us to identify the important processes involved in the functioning of the sediments selected for study. The results of the study indicated that the rates of NaR and denitrification were the same, whereas other nitrate reduction processes (DNRA, anammox) were extremely low. Based on these findings, we can deduce that almost all nitrate reducers are most likely denitrifiers, as shown by (Herbert 1999).

Phases 2 and 3 corresponded to salinity fluctuations. Overall, the rates of denitrification, NaR and Nw were higher in SA3 (under marine influence) than in SA1 (under freshwater inputs) in all tested salinity fluctuation scenarios. Moreover, the denitrifying and nitrate-reducing communities showed different responses through their activity rates according to station. Both rates remained constant in SA3. In contrast, the modification of salinity in SA1 in phase 2 induced an increase in the activity rates. This result suggested that the resistance of the SA3 denitrifying and nitrate-reducing communities to salinity fluctuations was higher than that of the SA1 communities. The analysis of nitrification showed that the first saline stress did not induce any change in the Nw rates in the sediments from either station. However, the trends in the 3rd phase differed according to

the station: an increase in rates was observed in SA1-M5 ($\Delta S=+15$), whereas the highest Nw rate in SA3 was recorded in M2 ($\Delta S=-10$ and maintained as in phase 2). All these results showed that during phases 2 and 3, when salinity fluctuated, both stations presented different responses to the salinity-change scenarios. As the nitrate, ammonium and SSW characteristics were similar (except salinity) in all microcosms, it is probable that the long-term salinity fluctuations encountered in SA1 induced a shift in the structure of the corresponding communities. Similarly, Baho et al. (2012) have shown in experimental studies that salt perturbations affect microbial community composition. Furthermore, the influence of disturbances on the community depends strongly on their frequencies. Species richness is low, medium and high for frequent, rare and medium disturbances, respectively. Consequently, the response of a community to a perturbation may be adjusted depending on differences in species richness. This principle is consistent with the results of a study by Elmqvist et al. (Elmqvist et al. 2003), which showed that biological diversity can enhance resilience and sustain desirable ecosystem states in the presence of a change. Most likely, the diversity at SA3 (permissive zone, low frequencies of salinity change) is higher than at SA1 (selective zone, higher frequencies of salinity change). It should be also emphasised that denitrifiers and nitrate reducers are phylogenetically widespread. Many species perform these functions. A high degree of functional redundancy among these species might still have allowed them to maintain the rate of activity, whatever the fluctuation scenario, during all the experiments in the SA3 sample and to return to the initial rate in phase 3 (resilience) in the SA1 sample. It is well known that nitrifiers are phylogenetically less diverse and only include beta and gamma *Proteobacteria* and *Thaumarchaeota*. It is possible that, depending on the scenario, relatively few species with special properties could be selected. This hypothesis may explain the differences found in the responses of

all SA3 microcosms and of the SA1-M5 microcosm during phase 3. Our results suggest that Nw showed a lower resilience capacity than denitrification or NaR.

6. Conclusions

In this study, we used a microcosm approach to examine the impacts of salinity fluctuations on nitrogen processes associated with microbial activity in sediments from the Berre lagoon. This microcosm approach showed that, depending on the station, the nitrogen processes responded differently to salinity changes. Furthermore, denitrification and NaR showed the same response, whereas nitrification showed different trends in response to salinity fluctuations. Detecting that an ecosystem is far from its normal disturbance-recovery balance often requires long-term data because disturbance-recovery cycles can be very slow, and only long-term data reveal the types of ecosystem variation (Palumbi et al. 2008). The temporal scale of a study will also affect judgements of the stability or persistence of a population or community (Connell and Sousa, 1983). Moreover, under real conditions, saltwater intrusion or nutrient additions to Berre lagoon may supply additional bacterial populations that can potentially increase microbial activity in the sediment. Our results open new questions about the combined role of various long-term environmental factors and the microbial community that might actively respond to these disturbances and show that the response to a perturbation of a community involved in biogeochemical processes depends on the temporal pattern of the previous stresses experienced by the community.

7. Acknowledgements

This work was supported by grants from LMGEM Axe Transverse. We would like to thank American Journal Experts for English correction (Premium Editing). I.Z. is supported by a PhD fellowship from the Tunisian Ministry of Education, Scientific Research and Technology. We are also thankful to the IZOFLUX ANR program, the GIPERB and the N.O. Antedon II crew.

8. References

- Baho DL, Peter H, Tranvik LJ (2012) Resistance and resilience of microbial communities - temporal and spatial insurance against perturbations. *Environmental Microbiology* 14:2283-2292
- Bernhard AE, Tucker J, Giblin AE, Stahl DA (2007) Functionally distinct communities of ammoniaoxidizing bacteria along an estuarine salinity gradient. *Environmental Microbiology* 9:1439-1447
- Bonin P (1996) Anaerobic nitrate reduction to ammonium in two strains isolated from coastal marine sediment: A dissimilatory pathway. *Fems Microbiology Ecology* 19:27-38
- Bonin P (2000) Le cycle de l'azote dans les écosystèmes marins côtiers. *Oceanis* 26:697-710
- Bonin P, Omnes P, Chalamet A (1998) Simultaneous occurrence of denitrification and nitrate ammonification in sediments of the french mediterranean coast. *Hydrobiologia* 389:169-182
- Brooks PD, Stark JM, Mcinteer BB, Preston T (1989) Diffusion Method to Prepare Soil Extracts for Automated N-15 Analysis. *Soil Sci Soc Am J* 53:1707-1711
- Campos JL, Mosquera-Corral A, Sanchez M, Mendez R, Lema JM (2002) Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in an activated sludge unit. *Water Research* 36:2555-2560
- Carpenter WS, Lee BC, Gunderson PD, Stueland DT (2002) Assessment of personal protective equipment use among Midwestern farmers. *Am J Ind Med* 42:236-247
- Castel J, Caumette P, Herbert R (1996) Eutrophication gradients in coastal lagoons as exemplified by the Bassin d'Arcachon and the Etang du Prevost. *Hydrobiologia* 329:R9-R28

- Connell JH, Sousa WP (1983) On the Evidence Needed to Judge Ecological Stability or Persistence. *Am Nat* 121:789-824
- Delpy F, Pagano M, Blanchot J, Carlotti F, Thibault-Botha D (2012) Man-induced hydrological changes, metazooplankton communities and invasive species in the Berre Lagoon (Mediterranean Sea, France). *Marine Pollution Bulletin* 64:1921-1932
- Dong LF, Smith CJ, Papaspyrou S, Stott A, Osborn AM, Nedwell DB (2009) Changes in Benthic Denitrification, Nitrate Ammonification, and Anammox Process Rates and Nitrate and Nitrite Reductase Gene Abundances along an Estuarine Nutrient Gradient (the Colne Estuary, United Kingdom). *Appl Environ Microb* 75:3171-3179
- Elmqvist T, Folke C, Nystrom M, Peterson G, Bengtsson J, Walker B, Norberg J (2003) Response diversity, ecosystem change, and resilience. *Front Ecol Environ* 1:488-494
- Fear JM, Thompson SP, Gallo TE, Paerl HW (2005) Denitrification rates measured along a salinity gradient in the eutrophic Neuse River Estuary, North Carolina, USA. *Estuaries* 28:608-619
- Folke C, Carpenter S, Walker B, Scheffer M, Elmqvist T, Gunderson L, Holling CS (2004) Regime shifts, resilience, and biodiversity in ecosystem management. *Annu Rev Ecol Evol S* 35:557-581
- Gardner WS, McCarthy MJ, An SM, Sobolev D, Sell KS, Brock D (2006) Nitrogen fixation and dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) support nitrogen dynamics in Texas estuaries. *Limnol Oceanogr* 51:558-568
- Giblin AE, Weston NB, Banta GT, Tucker J, Hopkinson CS (2010) The Effects of Salinity on Nitrogen Losses from an Oligohaline Estuarine Sediment. *Estuar Coast* 33:1054-1068
- Gilbert F, Souchu P, Bianchi M, Bonin P (1997) Influence of shellfish farming activities on nitrification, nitrate reduction to ammonium and denitrification at the water-

- sediment interface of the Thau lagoon, France. *Marine Ecology-Progress Series* 151:143-153
- GIPREB Odm (2010) Etang de Berre Suivi écologique du milieu Rapport de synthèse 2009-2010.
- Glibert PM, Lipschultz F, Mccarthy JJ, Altabet MA (1982) Isotope-Dilution Models of Uptake and Remineralization of Ammonium by Marine Plankton. *Limnol Oceanogr* 27:639-650
- Gouze E, Raimbault P, Garcia N, Bernard G, Picon P (2008a) Nutrient and suspended matter discharge by tributaries into the Berre Lagoon (France): The contribution of flood events to the matter budget. *Cr Geosci* 340:233-244
- Gouze E, Raimbault P, Garcia N, Picon P (2008b) Nutrient dynamics and primary production in the eutrophic Berre Lagoon (Mediterranean, France). *Transitional Waters Bulletin* 2:17-40
- Gu C, Laverman AM, Pallud CE (2012) Environmental controls on nitrogen and sulfur cycles in surficial aquatic sediments. *Frontiers in Microbiology* 3:1-11
- Herbert RA (1999) Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *Fems Microbiology Reviews* 23:563-590
- Holling CS (1973) Resilience and stability of ecological systems. *Annual Review of Ecology and Systematics* 4:1-23
- Howarth R, Chan F, Conley DJ, Garnier J, Doney SC, Marino R, Billen G (2011) Coupled biogeochemical cycles: eutrophication and hypoxia in temperate estuaries and coastal marine ecosystems. *Front Ecol Environ* 9:18-26
- Jackson CR, Vallaire SC (2009) Effects of Salinity and Nutrients on Microbial Assemblages in Louisiana Wetland Sediments. *Wetlands* 29:277-287
- Jantti H, Stange F, Leskinen E, Hietanen S (2011) Seasonal variation in nitrification and nitrate-reduction pathways in coastal sediments in the Gulf of Finland, Baltic Sea. *Aquatic Microbial Ecology* 63:171-181

- Kérouel R, Aminot A (1997) Fluorometric determination of ammonia in sea and estuarine waters by direct segmented flow analysis *Marine Chemistry* 57:265-275
- Kjerfve B (1985) Comparative Oceanography of Coastal Lagoons. *Estuaries* 8:A3-A3
- Kjerfve B, Schettini CAF, Knoppers B, Lessa G, Ferreira HO (1996) Hydrology and salt balance in a large, hypersaline coastal lagoon: Lagoa de Araruama, Brazil. *Estuar Coast Shelf S* 42:701-725
- Koike I, Hattori A (1978) Simultaneous determinations of nitrification and nitrate reduction in coastal sediments by a ^{15}N dilution technique. . *Marine Ecology-Progress Series* 35:853-857
- Laverman AM, Canavan RW, Slomp CP, Van Cappellen P (2007) Potential nitrate removal in a coastal freshwater sediment (Haringvliet Lake, The Netherlands) and response to salinization. *Water Research* 41:3061-3068
- Levin S (2001) *Fragile Dominion: Complexity and the Commons*. *Agriculture and Human Values* 18:239-240
- Levin SA, Lubchenco J (2008) Resilience, robustness, and marine ecosystem-based management. *Bioscience* 58:27-32
- Magalhaes CM, Joye SB, Moreira RM, Wiebe WJ, Bordalo AA (2005) Effect of salinity and inorganic nitrogen concentrations on nitrification and denitrification rates in intertidal sediments and rocky biofilms of the Douro River estuary, Portugal. *Water Research* 39:1783-1794
- Minjeaud L, Bonin P, Michotey V. (2008) Nitrogen fluxes from marine sediments: Quantification of the associated co-occurring bacterial process *Biogeochem.* 90:141-157
- Nerini D, Mante C, Durbec J-P, Garcia F (2001) Une méthode statistique de détermination de séquences caractéristiques dans une série temporelle de plusieurs variables.

Application à la physico-chimie des eaux de l'étang de Berre Earth and Planetary Sciences 332:457-464

Nielsen K, Risgaard-Petersen N, Somod B, Rysgaard S, Bergo T (2001) Nitrogen and phosphorus retention estimated independently by flux measurements and dynamic modelling in the estuary, Randers Fjord, Denmark. Marine Ecology-Progress Series 219:25-40

Nishio T, Koike I, Hattori A (1983) Estimates of Denitrification and Nitrification in Coastal and Estuarine Sediments. Appl Environ Microb 45:444-450

Ogilvie B, Nedwell DB, Harrison RM, Robinson A, Sage A (1997) High nitrate, muddy estuaries as nitrogen sinks: The nitrogen budget of the River Colne estuary (United Kingdom). Marine Ecology-Progress Series 150:217-228

Palumbi SR, Mcleod KL, Grunbaum D (2008) Ecosystems in action: Lessons from marine ecology about recovery, resistance, and reversibility. Bioscience 58:33-42

Rysgaard S, Thastum P, Dalsgaard T, Christensen PB, Sloth NP (1999) Effects of salinity on NH_4^+ adsorption capacity, nitrification, and denitrification in Danish estuarine sediments. Estuaries 22:21-30

Spott O, Stange CF (2007) A new mathematical approach for calculating the contribution of anammox, denitrification and atmosphere to an N_2 mixture based on a N_2 tracer technique. Rapid Commun Mass Sp 21:2398-2406

Thamdrup B, Dalsgaard T (2002) Production of N_2 through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. Appl Environ Microb 68:1312-1318

Treguer P, Le Corre P (1975) Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer. Université de Bretagne Occidentale

Walker B, Holling CS, Carpenter SR, Kinzig A (2004) Resilience, Adaptability and Transformability in Social-ecological Systems Ecology and Society 2:5

Zaghmouri I, Michotey V, Guasco S, Raimbault P, Garcia N, Bernard G, Bonin P (2013) Trends in salinity and inorganic nitrogen compounds in Berre Lagoon (1994-2011). Bacterial activities and nitrogen budgets. Marine Poll Bull 10.1016/j.marpolbul.2012.11.046

Chapitre V

Short-term responses towards
salinity changes of microbial and
nitrifying communities of
sediments exposed to long-term in
situ stresses: a microcosm
approach

Chapitre V: Short term response toward salinity changes of microbial and nitrifying communities of sediments exposed to different long-term in situ stresses: a microcosm approach

En rédaction pour soumission dans Microbial Ecology

Imen Zaghmouri, Axel Aigle, Patricia C. Bonin , Cecile Militon, Sophie Guasco, , and
Valerie D. Michotey *

*Aix-Marseille Université, Université du Sud Toulon-Var, CNRS/INSU, IRD, MIO, UM 110,
13288, Marseille, Cedex 09.*

*Address for correspondence: Bonin P., Mediterranean Institute of Oceanography (MIO)
Campus de Luminy, Case 901, 13288 Marseille Cedex 9, France.*

*Email: valerie.michotey@univ-amu.fr

Tel.: 33 491829336

Fax: 33 491829641

Avant propos

Les microorganismes occupent des rôles clés dans le stockage des sels nutritifs et sont impliqués dans les transformations biogéochimiques de ces éléments. Leurs capacités métaboliques soutiennent une large gamme de processus (Newton et al. 2011). Malgré l'importance potentielle d'une perturbation vis-à-vis de la diversité et du fonctionnement des communautés, les facteurs de perturbation ont longtemps été négligés.

Lorsqu'une communauté microbienne est soumise à une perturbation, il est probable que le retour à l'état de pré-perturbation (d'un point de vue composition et fonction) serait facilité par des « refuges » dans lesquels les populations qui ne sont pas affectées par la perturbation puissent survivre. Un stress peut, néanmoins, déclencher des changements dans la composition de la communauté de manière réversible ou irréversible (Baho et al. 2012).

Dans le précédent chapitre de ce travail de thèse, une approche en microcosmes a été utilisée pour examiner l'impact des fluctuations de la salinité sur les activités du cycle de l'azote. Ces activités étant fortement dépendantes des microorganismes présents, ce chapitre fait suite au précédent et vise à mettre en évidence l'impact de ces variations de salinité sur l'abondance et la composition des communautés microbiennes présentes, notamment celles responsables de la première étape du processus de nitrification. En effet, ce processus joue un rôle pivot dans le cycle de l'azote des sédiments de l'étang de Berre, puisque la plupart du nitrate dénitrifié, et donc éliminé de l'écosystème sous forme de N_2 , provient du couplage nitrification-dénitrification. Des échantillons de

sédiment ont été prélevés à T0 (avant l'incubation des microcosmes) et à Tf (à la fin de l'incubation).

Dans l'ensemble, les communautés avaient des abondances spécifiques au site de prélèvement mais changeaient faiblement au sein des microcosmes. La communauté nitrifiante a présenté des souches ubiquistes, montrant une résistance et/ou une adaptation suite aux changements de la salinité. Cependant, lorsque les fluctuations de la salinité sont d'une grande ampleur, une nouvelle souche est apparue, en plus des souches communes, soulignant un léger changement dans la composition de la communauté.

1. Abstract

Temporal and spatial dynamics within the ammonia-oxidizing (AO) community from coastal lagoon sediments were studied in microcosms simulating salinity fluctuations recorded in two stations: SA1 located in the northern part of the lagoon directly under the inflows of freshwater and SA3 in the southern part of the lagoon mainly influenced by the marine water inflows. Community abundances were estimated by quantifying gene copies of the ammonia monooxygenase subunit (*amoA*) and their activity rates by transcripts number quantification. AO were site-specific (SA1>SA3) and showed overall minor changes in their abundances among microcosms. Ammonium Oxidizing *Archaea* (AOA) *amoA* gene and transcripts largely dominated in SA1 microcosms compared to the Ammonium Oxidizing *Bacteria* (AOB) counterpart, while in SA3 microcosms, the percentage of AOB *amoA* transcripts was accompanied by an increase of nitrification process. AOA presented similar community in both stations and salinity fluctuations had little impact on the structure of the community. In both station, the effect of salinity fluctuation was still visible 5 days after the return back to the initial salinity.

2. Introduction

Microbial community structure has a significant influence on the turnover of nutrients in sediment and water column (Dandie et al. 2007). The productivity of a lagoon ecosystem is partly determined by sources and sinks of different nitrogen forms (Nixon 1995). A complex interplay of both biological and environmental factors controls the flux of alternative nitrogen forms. Knowledge of the spatial patchiness of the microbial community is important for addressing basic ecological questions such as which factors may control microbial communities (Scala & Kerkhof 1998). Within the biological system, the oxidation of ammonia to nitrite by ammonia-oxidizing micro-organisms is generally thought to play a central role in determining the fate of nitrogen (Bernhard et al. 2005). Nitrification, the sequential oxidation of ammonium to nitrite and then to nitrate, occurs in a wide variety of environments. It is a key part of nitrogen transformations and is crucial to ecosystem processes (Bernhard et al. 2007a, He et al. 2007) since the rate of nitrite and nitrate production often determine the denitrification rate which in turn lead to the removal of nitrogen from the ecosystem. The microorganisms that mediate the first step of nitrification are divided into ammonia-oxidizing *Bacteria* and ammonia-oxidizing *Archaea*. Autotrophic ammonia-oxidizing *Bacteria* affiliated with the β - and δ -*Proteobacteria* have long been considered the only microorganisms able of carrying out nitrification (Purkhold et al. 2000). However, the discovery of ammonia-oxidizing *Archaea* (Könneke et al. 2005) has illustrated the lack of our current understanding about ammonia-oxidizing microorganisms (Bernhard et al. 2010). Ammonia-oxidizers are abundant in natural environments such as the water column, sediments, activated sludge bioreactors and soils (Francis et al. 2005). In pelagic system, Ammonium oxidizing *Archaea* (AOA) consistently outnumber β

Ammonium Oxidizing *Bacteria* (AOB), furthermore there is strong evidence for archaeal nitrification based on molecular and biogeochemical data (Beman & Francis 2006, Wuchter et al. 2006). In coastal systems, the results are ambiguous (Caffrey et al. 2007, Mosier & Francis 2008, Santoro et al. 2008) suggesting a more complex relationship in these systems. Due to the low number of cultivated AO strains, very few physiologic studies are available to understand the impact of environmental factors on the abundance and the activity of such microorganisms. Among these factors, salinity has been shown to be important in controlling the abundance of AOB (Stehr et al. 1995, Cebron et al. 2003) and nitrification rate (Rysgaard et al. 1999, Cebron et al. 2003), with higher abundance of AOB and greater nitrification rates in freshwater than in marine systems. Changes in salinity in natural sample may be accompanied with changes in other physico-chemical parameters with possible consequences for the biogeochemical processes. Indeed, apart osmotic impact on cells, salinity plays a major role on substrate availability, in controlling NH_4^+ adsorption capacity, and then nitrification, of the sediment with increased NH_4^+ efflux as salinity increases (Boynton & Kemp 1985). Several studies have shown the impact of salinity variation on nitrogen activities of lagoon systems (Seitzinger 1988, Rysgaard et al. 1999, Zaghmouri et al. 2013). The salinity changes may also affect the structure and the composition of communities (Bernhard et al. 2007a) favoring community with different ecophysiological properties. Actually, our understanding about the time scale of these changes is still incomplete, especially under natural conditions (Coci et al. 2005). To investigate the relationships between short-term salinity variations and microbial community structure and its activity, we used microcosms filled with two sediment samples from the Berre lagoon (SE France) that can be distinguished by their contrasting long term salinity patterns (SA1: frequent salinity changes; SA3: less frequent changes). Diversity and abundance of

the total community and particularly the nitrifying one were analyzed after different scenarios of salinity fluctuations in the microcosms. Activity of AO organisms were quantified by AOA and AOB *amo* transcripts abundances and measurement of total nitrifying rates.

3. Materials and methods

3.1 Sediment sampling and Microcosms set up

The sediments were originated from the brackish semi-enclosed Berre lagoon (SE France, Fig. V.1), which provides a particular historical record of salinity (Zaghmouri et al. 2013). Freshwater (from the natural tributaries; the Arc and the Touloubre Rivers) and marine waters (from the channel connecting the lagoon to the Mediterranean Sea) arrive from the northern and the southern parts of the lagoon, respectively (Fig. V.1). Since 1966, additional large amounts of freshwater inputs that did not originally belong to watershed of this lagoon were introduced in the northern part, by a hydroelectric power plant (deviation of the Durance River) throughout the water column salinity presents temporal and punctual variations ranging from 11 to 36 (Delpy et al. 2012b). Sediments were collected at two stations that can be distinguished by their contrasting salinity patterns (Fig. V.1). The first one (SA1~6 m deep) is located in the northern part of the lagoon in front of natural and artificial tributaries and is subject to freshwater loads in a fluctuating mode. Its mean annual salinity ranges between 15 and 30. The second one (SA3 ~9 m deep) is located in the southern part of the lagoon close to the channel connected to the sea and is under marine influence; its mean annual salinity ranges from 21 to 35 (Zaghmouri et al. 2013).

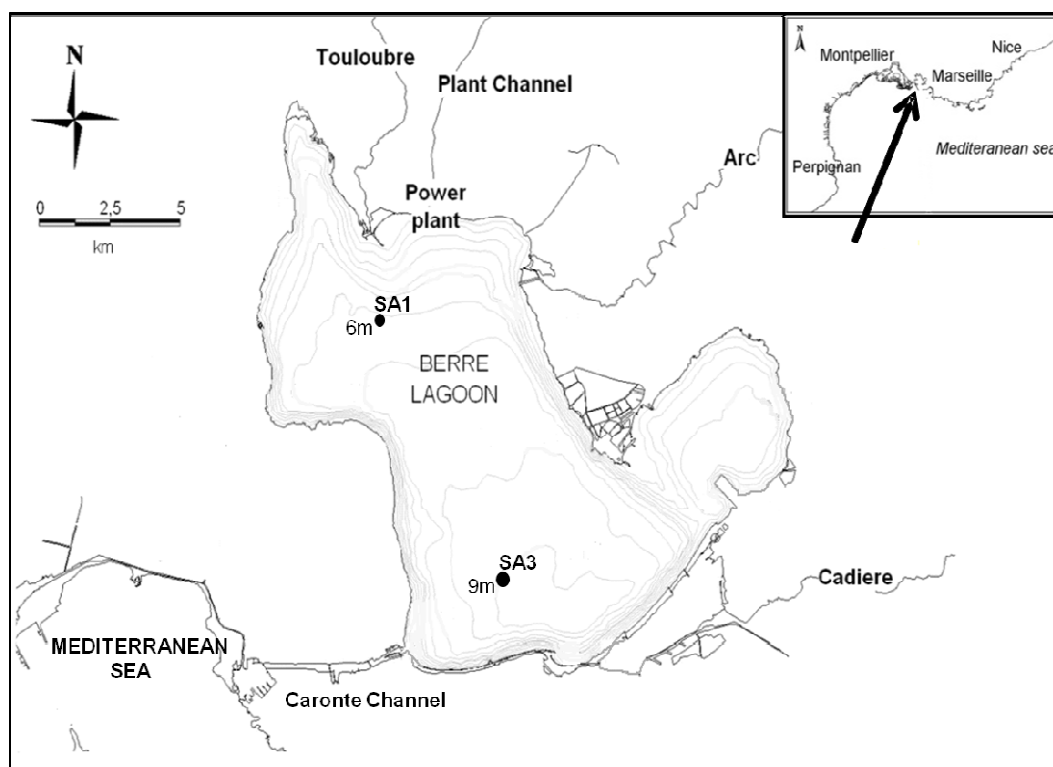


Fig. V. 1 Location of the sampling stations SA1 (43°29.735N, 5°2.953E, 6 m deep) and SA3 (43°25.300N, 5°6.219E, 9 m deep) in the Berre lagoon (SE France)

The sediments were collected in December 2010 at SA3 (with an *in situ* salinity of 33 and *in situ* temperature of 15.9°C) and in March 2011 at SA1 (with an *in situ* salinity of 24 and *in situ* temperature of 14.6°C). Undisturbed sediments were collected in PVC cores of the same diameter (10 cm) than into the microcosms (cylinders of 10 cm in diameter and 25 cm in height). These microcosms were filled to their bottom half (12 cm) with undisturbed sediment and were fully re-filled with synthetic seawater (SSW, containing 22.32 g.L⁻¹ of MgSO₄·7H₂O, 0.9 g.L⁻¹ of KCl and 7.26 g.L⁻¹ of TRIS and NaCl to reach the desired salinity) and hermetically closed to the atmosphere to avoid any gaseous headspace. Each microcosm was equipped with an inflow and outflow device. Water was pumped via a peristaltic pump from the 5 L reservoir to the individual

microcosms at a flow rate of 0.09 L.h^{-1} , generating a residence time of approximately 10.5 h in each microcosm. The reservoirs were open and provided with a stream of air bubbles to maintain air saturation in the water phase. In each reservoir, salinity was measured by refractometry. The salinity of the synthetic seawater (SSW) was adjusted by adding NaCl. The SSW in each microcosm reservoir was renewed at the beginning of each salinity fluctuation phase. The microcosms were incubated at the *in situ* temperature.

To assess the impact of salinity variations on global microbial and on nitrifying communities, sediments in microcosms were subjected to various scenarios of salinity fluctuations mimicking those recorded in the lagoon as described in Fig. V.2.

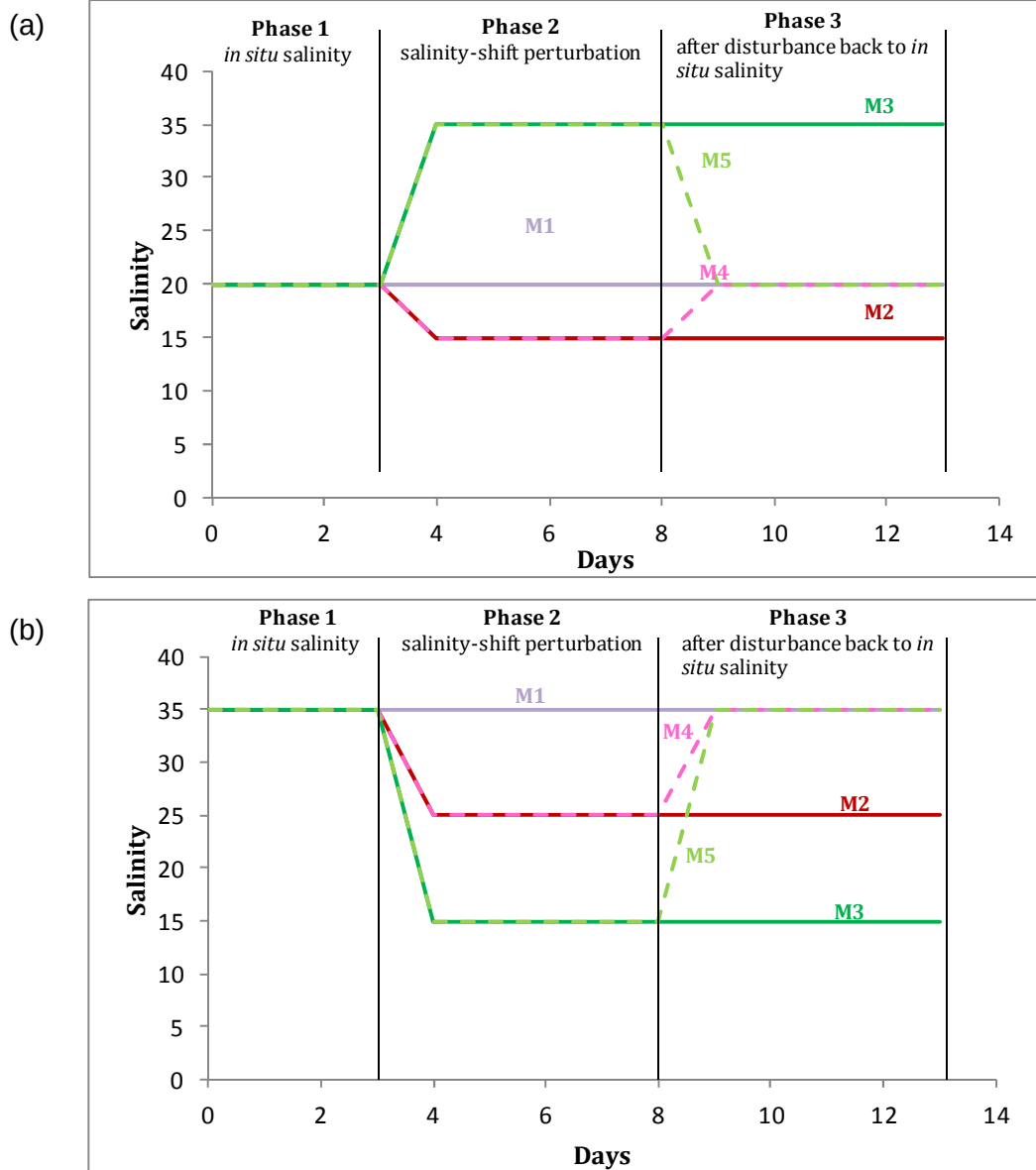


Fig. V. 2 Summary diagrams of salinity fluctuation scenarios in the SA1 sediment (collected in March 2011) (a) and SA3 sediment (collected in December 2010) (b). M1 microcosms served as controls and were maintained close to the *in situ* salinity throughout the experiment. During the 1st *in situ* salinity phase (3 days), all microcosms were maintained close to the *in situ* salinity to stabilise the system ($S=20$ for SA1 and $S=35$ for SA3). During the 2nd phase or salinity-shifting phase (~ 0.5 days of transition plus 4.5 days of stability), the M2 and M4 microcosms were subjected to a salinity decrease ($S=15$ for SA1 and $S=25$ for SA3), whereas two others (M3 and M5) were subjected to the most extreme salinity values recorded in the lagoon during the last 20 years (35 for SA1 and 15 for SA3, GIPREB, 2011). During the 3rd phase or the after disturbance back to *in situ* salinity phase (~ 0.5 days of transition plus 4.5 days of stability), regardless of the sediment, the M2 and M3 microcosms were maintained at the same salinity as in phase 2, whereas the M4 and M5 microcosms were back to the initial *in situ* salinities as in phase 1.

Microcosms were numbered from M1 to M5 for each sampling site. For both sediment types, the M1 microcosms served as controls and were maintained close to the *in situ* salinity throughout the experiment. After 3 days at the *in situ* salinity, the M2 and M3 microcosms were subjected to a unique shift of salinity and were maintained at this salinity for 10 days; whereas the two others (M4 and M5) were subjected to two consecutive shifts of 5 days each (Fig. V.2). At the end of the experiment (T_{d13}), undisturbed sediment cores (length 12 cm, 3 cm inner diameter) were sub-sampled within each microcosm without destroying the vertical structure of the sediment. The sub-cores were filled to their bottom half with sediment and to their top half with the same synthetic seawater as in the microcosms at the same salinity. Nitrifying activity was assessed immediately whereas the top 2 cm of the sediment samples were stored at -80°C , for molecular analysis.

3.2 Total nitrification rates

Total nitrification activity was measured in the sediments at the end of the salinity fluctuation experiment (T_{d13}), for the 5 microcosms of each station. $^{15}\text{NO}_3^-$ was added (99.6% atom %, Isotec Matheson) into the sub-cores with a final concentration of 250 μM . The total sediment nitrification rate includes then nitrification providing NO_3^- to the water column (N_w) and the nitrification coupled to the denitrification (D_n , IPT) (Jantti et al. 2011). The cores were incubated at the *in situ* temperature during 6 h (with duplicate cores for T_0 and T_6). Previous study has shown that these rates were linear during this incubation time. Rates have been assessed as previously described (Zaghmouri et al. 2013). At T_{d13} nitrate/ nitrite and ammonium concentrations were also measured in the

overlying water by colorimetric (Treguer & Le Corre 1975) and by fluorometric method (Kérouel & Aminot 1997), respectively.

3.3 Molecular studies

DNA was extracted from 0.25 g of sediment (0-2 cm depth) in duplicate using the DNA kit PowerSoil (MO BIO[®], Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. The DNA was stored at -20   C. Total RNA was extracted from 2 g of sediment (0-2 cm depth) using the RNA kit PowerSoil (MO BIO[®], Carlsbad, CA). Putative traces of DNA were removed by the Turbo DNase-free digestion (AMBION[®], Austin, Texas). The RNA was stored at -80  C. cDNA was synthesized from about 50-200 ng of RNA using random primer (Promega kit[®], Madison, WI).

3.3.1 Molecular Fingerprinting Analysis of Microbial and nitrifying communities

DGGE analysis was performed using the GML5F – 907MR primer set for *Bacteria* (Bonin et al. 2002, Goregues et al. 2005) and 344f – 915R primer-set for *Archaea* (Casamayor et al. 2002) targeting the variable regions of SSU rRNA gene. To improve resolution of DGGE analysis, primers GML5F-GC or 344f-GC contained a 40-nucleotide GC-rich sequence at the 5' end. PCR amplifications were carried out in 20   L reaction mixtures containing 1-2 ng of template DNA, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of dNTP, 1.25 or 0.31  M of each primer for *Bacteria* and *Archaea* respectively, and 1 U of Hot start polymerase plus 1   L of solution Q (Qiagen, Germany). The thermal cycling programs were similar to those previously described (Casamayor et al. 2002, Michotey et al. 2012). The amplifications of AOB and AOA genes were performed using amoA-B1F-amoA-B2R primer set (Rotthauwe et al. 1997) and CrenamoA-23f and CrenamoA616r (Tourna et al. 2008), respectively. The reaction mixture (Taq-Mastermix & LOADTM 5x, MP

Biomedicals) contains all the PCR constituents (PCR buffer 5X, dNTPs, Taq Polymerase, 1.5 mM MgCl₂), 1.25 mM of each primer and 20-80 ng of DNA were added. PCR of AOB gene consisted on 35 cycles harboring a denaturing step (30 s at 95 °C), a phase of primer annealing (30 s at 55 °C), an elongation step (45 s at 72 °C) and a final extension of 10 min at 72° C. The AOA gene amplification program presented 40 cycles consisting on a denaturing phase (45 s at 94 °C), a phase of primer annealing (1 min at 55 °C), a phase elongation (1 min at 72 °C) and a final extension of 3 min at 72 °C.

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) was performed using a D-code Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories Inc.). Equal amounts of PCR products were loaded in each lane (~200 ng for *amoA* and ~300 ng SSU rRNA gene). The 1 mm thick, 6% (wt. /vol) polyacrylamide gels presented a denaturing gradient of 30%- 50% for SSU rRNA gene fragment analysis or 20–50% for *amoA* fragment analysis. After staining the bands with Ethidium Bromide and photographing the gel, banding patterns across the gels were normalized using a previously constructed ladder composed of seven different bands that was loaded several times on each gel. Fingerprints observed on the gels were analyzed using GelCompar II software (Applied Maths, St-Martens-Latem Be). After normalization, automatic band detection was performed using a minimum profiling level of 5% relative to maximum. For DGGE patterns, calculation of the pairwise similarities of densitometric profiles was based on Pearson's correlation coefficient (Michener & Sokal 1957) to construct dendrograms using the Unweighted Pair-Group Method Analysis (GelCompare II software, Applied Maths, St-Martens-Latem, Be). Tables of band intensity were exported and were modified using XLstat software as Canonical Correspondence Analysis (CCA).

3.3.2 Communities' abundance

The quantification of bacterial and archaeal SSU rRNA and SSU rRNA gene copy numbers were determined by qPCR. For bacterial SSU rRNA, primer sets (GML5F-Uni516R) (Takai and Horikoshi, 2000) were used. The PCR reaction was performed with LightCycler® FastStart DNA Master SybGreen kit using LightCycler™ (Roche Diagnostics, CA, USA). Conditions were similar to those previously described (Michotey et al. 2012). For archaeal SSU rRNA (931F -m1100r) primer sets (Jackson et al. 2001b) were used and the PCR reaction was performed with LightCycler® FastStart DNA Master SybGreen kit using LightCycler™ (Roche Diagnostics, CA, USA). The program consists of a denaturing step of 10s, a hybridization step of 10s at 62°C, with an elongation step of 14s. For quantification, different quantities of template were tested. For SSU rRNA gene quantification, about 0.2 -1 ng DNA were added to the PCR mixture. For SSU rRNA quantification, 2 µl from 1/10 to 1/50 of the RT-reaction was used as template. Standards used for total *Bacteria* and total *Archaea* quantification corresponded to pGEMT plasmids harboring a Gamma Proteobacterial or a MG-II Euryarchaeotal SSU rRNA gene fragment, respectively. At the end of the PCR reaction, the specificity of the amplification was checked from the first derivative of their melting curves and by electrophoresis analysis.

Quantifications of genes and transcripts of AOB or AOA were determined by qPCR using either *amoA*-B1F-*amoA*-B2R (Rotthauwe et al. 1997) or *Arc-amoA*-mod-*Arc-amoA*-modR primer sets (*Arc-amoA*-modF, CWGAYTGGRYDTGGACHTC, *Arc-amoA*-modR TTTYKYYTYGTKDCCCAGTA) modified from (Wuchter et al. 2006) for improving sequence match with *amoA* sequences obtained from Berre sediment.

AmoA gene quantification was performed with Sso Advanced™ SyberGreen Supermix using a CFX96 Real Time System (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, CA, USA). About 20-80 ng of environmental DNA or 2 µl of the RT-reaction mixture were used as template. *Beta* Proteobacterial *amoA* fragment cloned in pGEMT plasmids were used as AOB *amoA* standards. The threshold for AOB-*amoA* quantification was assessed to 36 molecules/PCR. For AOA *amoA* standard curve building, corresponding gene fragment retrieved from Berre lagoon sediment and whose closest strain is *Nitrososphaera gargensis* was cloned in pGEMT plasmids. The threshold for AOA gene quantification was assessed to 94 molecules/PCR. At the end of the PCR reaction, the specificity of the amplification was checked from the first derivative of their melting curves and by electrophoresis analysis.

3.4 Statistical analysis

An ANOVA analysis was used to examine the influence of stations and microcosms on microbial processes and gene quantification data. The significance level for all tests was set at $p < 0.05$. All tests were performed with XLSTAT® (XLSTAT software® 2008, Addinsoft, Paris).

A Canonical Correspondence Analysis (CCA) was performed. It includes the microcosms and the initial sediment samples, the DGGE bands (i.e. strains), the *in situ* nitrate and ammonium concentrations and some nitrogen microbial activities (nitrification and denitrification).

A distance matrix including changes in total nitrification, coupled with some environmental variables and the different salinity treatments in the microcosms was

used in principle components analysis (PCA) to explore the response of the nitrification and environmental variables to salinity fluctuations. CCA and PCA were performed using XLSTAT® (XLSTAT software® 2008, Addinsoft, Paris).

4. Results

4.1 Total nitrification activity

Significant differences (ANOVA, $p < 0.05$) in total nitrification rates were observed between both stations; rates being higher in SA3 than in SA1 (Fig. V.3). In SA1 microcosms, the shifts up (M3S1) or down (M2S1) of salinity for 10 days have induced a significant decrease of nitrifying rate compared to the control M1S1 (t test, $p < 0.05$). After salinity decrease for a short period (in M4S1 during phase 2 for 5 days), the restoration of initial salinity (during phase 3) did not lead to rate recovery. In contrast, in the case of shift back to initial salinity after a salinity increase (M5S1), a significant partial restoration was observed without reaching the control rate (Fig. V.3) (t test, $p < 0.05$). SA3 sediment reacted differently from SA1. The decreases of salinity to 25 or 15 during 10 days (M2S3, M3S3) have induced a significant 3 fold increase of nitrifying activity (t test, $p < 0.05$). For shifts of shorter time (5 days) and return to initial salinity, one microcosm remained with high rates (M5S3) whereas the other (M4S3) presented a lower activity close to that of the control (Fig. V.3).

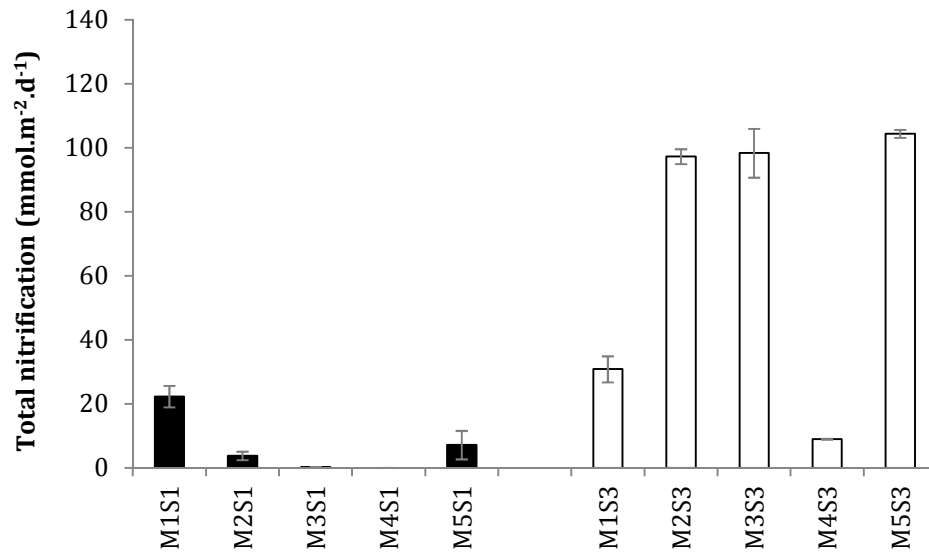


Fig. V. 3 Total nitrification rates as the sum of net nitrification (NO₃- released to the overlying water) and Dn (denitrification of NO₃- produced through nitrification) and SE measured in cores after sub-sampling of SA1 and SA3 microcosms.

4.2 AOA and AOB abundance (DNA and RNA)

The total prokaryotic communities were analyzed in microcosms via 16S rRNA gene (SSU) copy number (bacterial + archaeal SSU rRNA gene copy number). In Berre sediment, it ranged from $1.8 \cdot 10^8$ to $1.9 \cdot 10^9$ copies per gram of wet sediment (Fig. V.4).

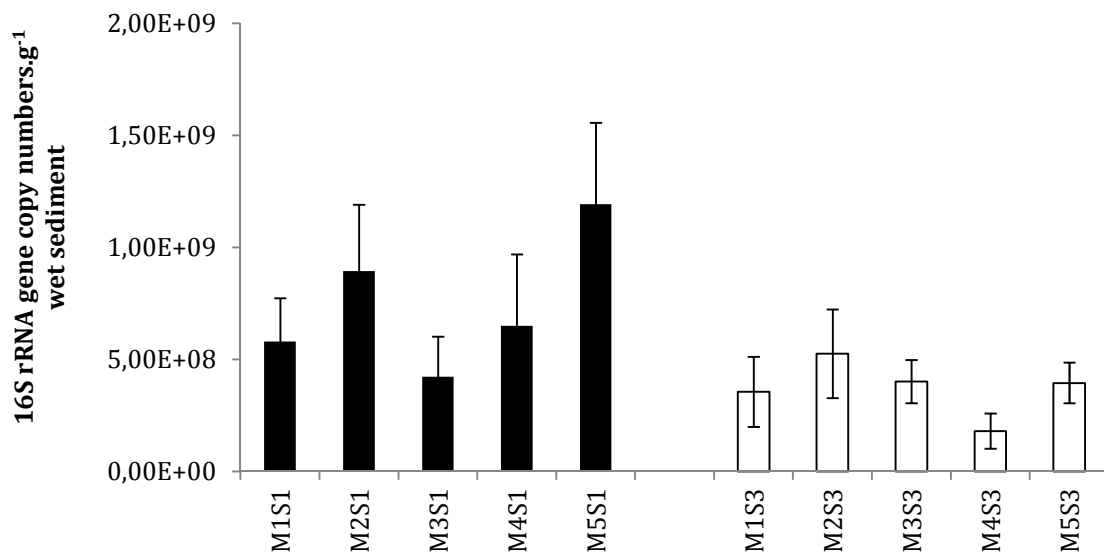


Fig. V. 4 Mean 16S rDNA gene copy numbers per gram of wet sediment in the top 0-2cm from SA1 and SA3 microcosms. Data represent triplicate samples.

Overall SSU rRNA gene number was higher in SA1 than in SA3 (ANOVA, $p < 0.05$). Whatever the station, the salinity scenarios did not induced any significant change in SSU rRNA gene copy numbers except for M5S1 (t test, $p < 0.05$). Among total prokaryotes, whatever the station or the salinity scenario, the percentage of SSU rRNA Archeal gene remained very low (less than 1%, Table V.1).

However, for SA3, a decreasing percentage of SSU rRNA Archeal gene was observed concomitantly with the decrease of salinity (0.32; 0.24 and 0.17 for $S=35$, $S=25$ and $S=15$, respectively, Table V.1).

Table. V. 1 Quantification of bacterial and archaeal SSU rRNA and *amoA* genes or transcripts

		DNA		RNA		
Microcosms	Salinity scenario	%SSU rRNA gene Arc/Tot	<i>amoA</i> AOA/AOB	%SSU rRNA Bact/Tot	% <i>amoA</i> AOB/ tot	<i>amoA</i> /M1
M1S1	20	0.43	167	> 99.99	> 99.99	1
M2S1	20-15	0.38	100	> 99.99	16.02	1.05
M3S1	20-35	0.32	124	> 99.99	18.27	1.19
M4S1	20-15-20	0.45	119	> 99.99	15.88	0.51
M5S1	20-35-20	0.37	54	> 99.99	17.73	1.90
M1S3	35	0.32	48	> 99.99	35.03	1
M2S3	35-25	0.24	57	> 99.99	> 99.99	116.35
M3S3	35-15	0.17	56	> 99.99	> 99.99	95.51
M4S3	35-25-35	0.40	155	> 99.99	> 99.99	103.51
M5S3	35-15-35	0.90	79	> 99.99	12.35	185.85

Furthermore, the return back to initial salinity (S=35) has provoked an increase of this percentage (0.4 and 0.9 for M4S3 and M5S3, respectively) (Table V.1). Nitrifying community was analyzed through *amoA* gene. As for SSU rRNA gene, a significant station effect was observed for *amoA* genes (AOB+AOA gene copy number) with SA1> SA3 (ANOVA, $p<0.05$). The total *amoA* gene abundance ranged from 4×10^5 to 1.56×10^6 gene copies per gram of wet sediment (Fig. V.5).

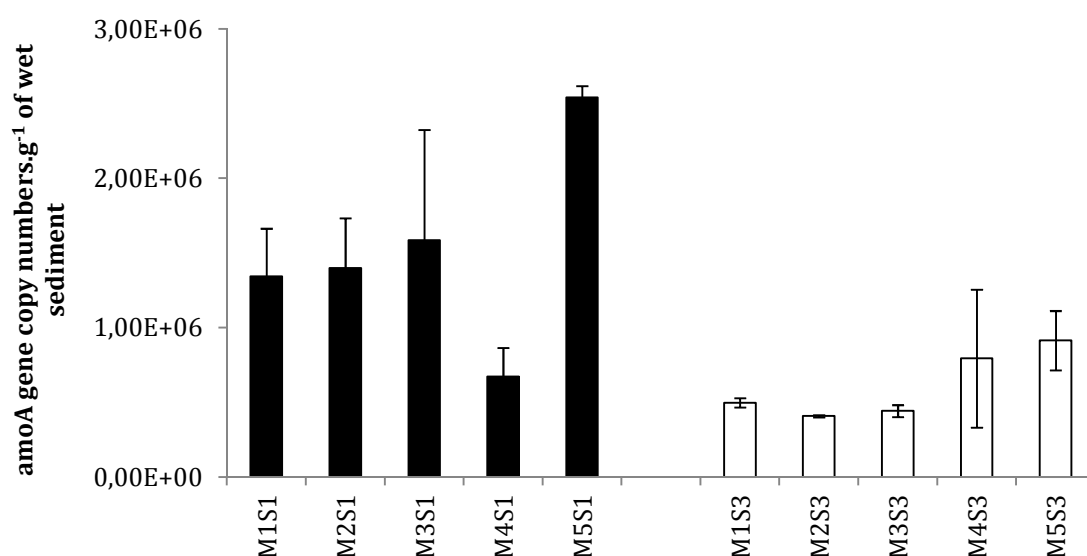


Fig. V. 5 Mean amoA gene copy numbers per gram of wet sediment in the top 0-2cm from SA1 and SA3 microcosms. Data represent triplicate samples.

Whatever the station or the salinity scenario, the AOA *amoA* genes were dominant over the AOB; the AOA *amoA* / AOB *amoA* ratio ranged between 167 and 54 in SA1 and between 155 and 48 in SA3 (Table V.1).

The activity of the community was analyzed through transcripts abundance. Bacterial 16S rRNA transcripts dominated largely the Archaeal ones, accounting for more than 99% (Table V.1). In station SA1, if AOB *amoA* transcripts largely dominated the AOA counterparts (>99%), salinity fluctuation have provoked a strong decrease of the percentage of AOB *amoA* transcripts (16.02% and 18.27% for M2S1 and M3S1, respectively versus more than 99% for the control M1S1) due to a strong increase of the expression of AOA, while the variation in AOB transcripts changed little. This effect lasted when two microcosms (M4S1, M5S1) returned back to the initial salinity after 5 days perturbation. No restoration of the initial AOB *amoA* percentage was observed and the activity state of AOA remained high. In contrast, in SA3, where AOA *amoA* transcripts

were dominant in the control, the decrease of the salinity induced an increase of AOB *amoA* percentage (>99% for M2S3 and M3S3 compared to 35.03 for the control M1S3), due to the decrease of AOA *amoA* transcripts when salinity reached 25 and 15. As observed for SA1, the 5 days salinity fluctuation still impacted the SA3 AO community after the return back to the initial salinity in M4S3. In SA3 sediment the increase of the percentage of AOB *amoA* transcripts was accompanied by an increase of nitrification activity determined by isotopic approach. The changes in *amoA* transcripts abundance were compared with those of the control (M1) (Table V.1). Results showed a lower change in transcripts abundances in SA1 microcosms' which were 0.5 to 1.9 fold higher than the control, whereas in SA3 microcosms, a high change in the community abundance was noticed with a factor of 100 times higher than in the control (Table V.1).

In order to test whether a relationship exists between *amoA* transcripts abundance and nitrification rates, both values were normalized with the controls (Fig. V.6). A relationship was found between the log of transcripts ratio and the nitrifying activity ratio (Pearson's correlation, $p < 0.01$, $R^2 = 0.89$), when M4S3 was excluded from the analysis (Fig. V.6).

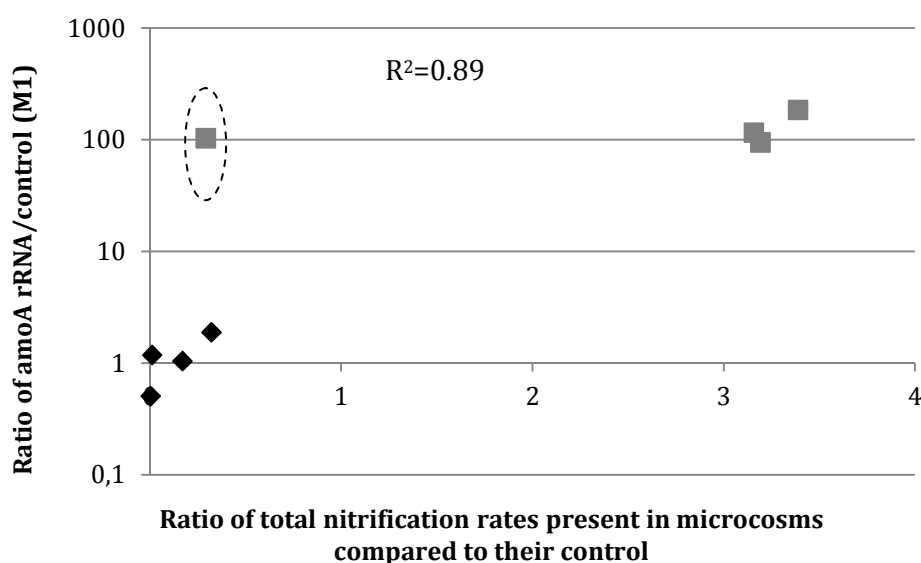


Fig. V. 6 Total amoA RNA abundance normalized to control (M1) versus total nitrification rates normalized to control (M1).

4.3 Diversity of total and ammonia oxidizing communities

Diversity among stations and salinity scenarios in microcosms was compared with DGGE based on SSU rRNA and *amo* gene analysis (Fig. V.7).

Analysis of bacterial ribosomal pattern revealed low divergence. Bacterial 16S rRNA gene presented similarity scale ranging between 87 and 100%. Microcosms of both stations were separated in distinct clusters except for M2S3 ((S=25) that belonged to S1 cluster (station under freshwater influences) (Fig. V.7a). M3S3 microcosm (S=15) corresponded to an out group.

Archaeal communities showed lower similarity among stations and higher impact toward salinity fluctuation (Fig. V.7b). For SA1, salinity changes have provoked a shift of community, all SA1 microcosms fell in a cluster that comprise M1S3 and that was

separated from control M1S1. All the other microcosms of SA3 were grouped in the other cluster.

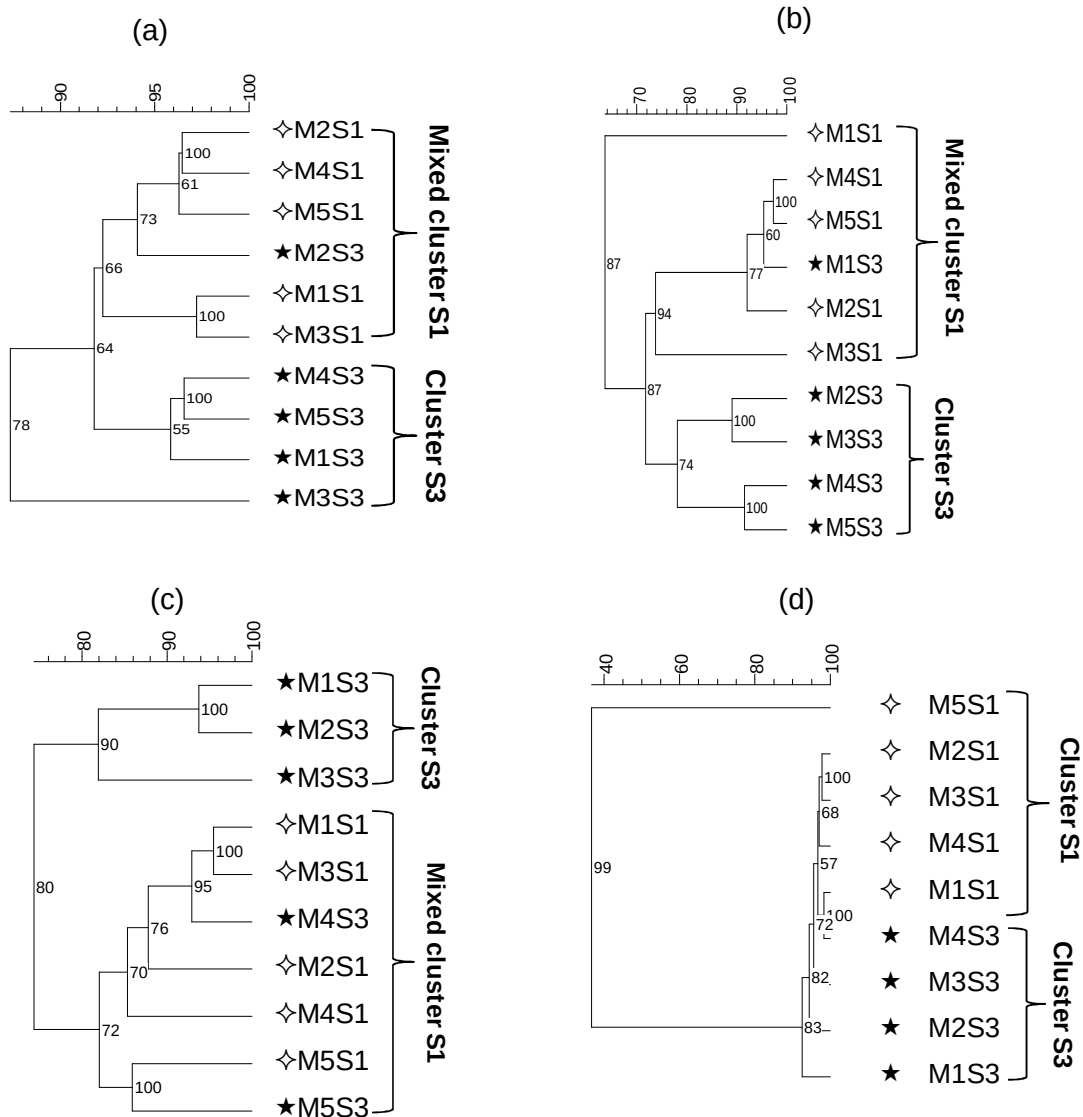


Fig. V. 7 Cluster analysis of microbial communities based on Pearson correlation derived from bacterial 16S rRNA gene (a), archaeal 16S rRNA gene (b), bacterial *amoA* (c) and archaeal *amoA* (d) genes in SA1 and SA3 microcosms.

White stars correspond to SA1 microcosms, dark stars to SA3 microcosms.

For AOB *amoA* gene (Fig. V.7c), one cluster grouped the control microcosm of SA3 (M1S3) and the ones (M2S3, M3S3) subjected to a unique salinity shift, whereas the other cluster comprised all SA1 microcosms and SA3 microcosms that have experienced

two salinity shifts. In contrast to AOB *amoA*, AOA *amoA* DGGE patterns (Fig. V.7d) revealed a very low diversity.

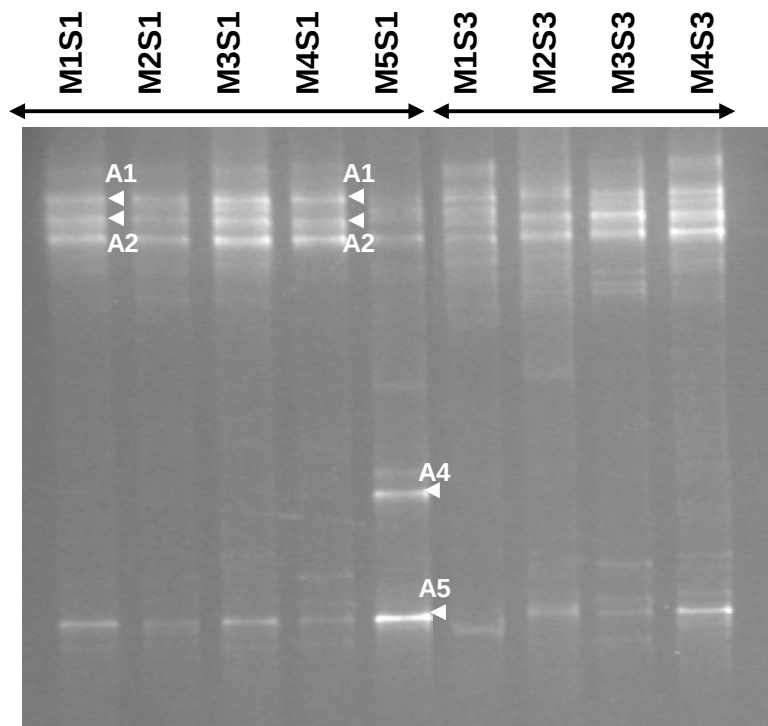


Fig. V. 8 DGGE from a PCR amplification of archaeal *amoA* gene. One replicate per salinity treatment is shown. Bands are numbered from A1 to A5. A3 band is not shown in the DGGE profile.

Most of the patterns exhibited identical bands (A1, A2, A5, Fig. V.8) whose sequences were affiliated in *Thaumarchaeota* group with *Nitrosphaera amoA* (Fig. V.9). A1 and A2 bands showed 100% of similarities between them and presented, 68% identity with *Candidatus Nitrososphaera viennensis* EN76 recovered from grassland or garden soil and with *Nitrososphaera* sp. JG1 recovered from agricultural soil. Band A5 showed 68% identity with *Candidatus Nitrososphaera gargensis* recovered from microbial mats of the Siberian Garga hot spring. M5S1 microcosm was distinguished from all the other microcosms by the apparition of news bands. The most intense, A4 was affiliated also to *Nitrosospheara* Lineage (Fig. V.9).

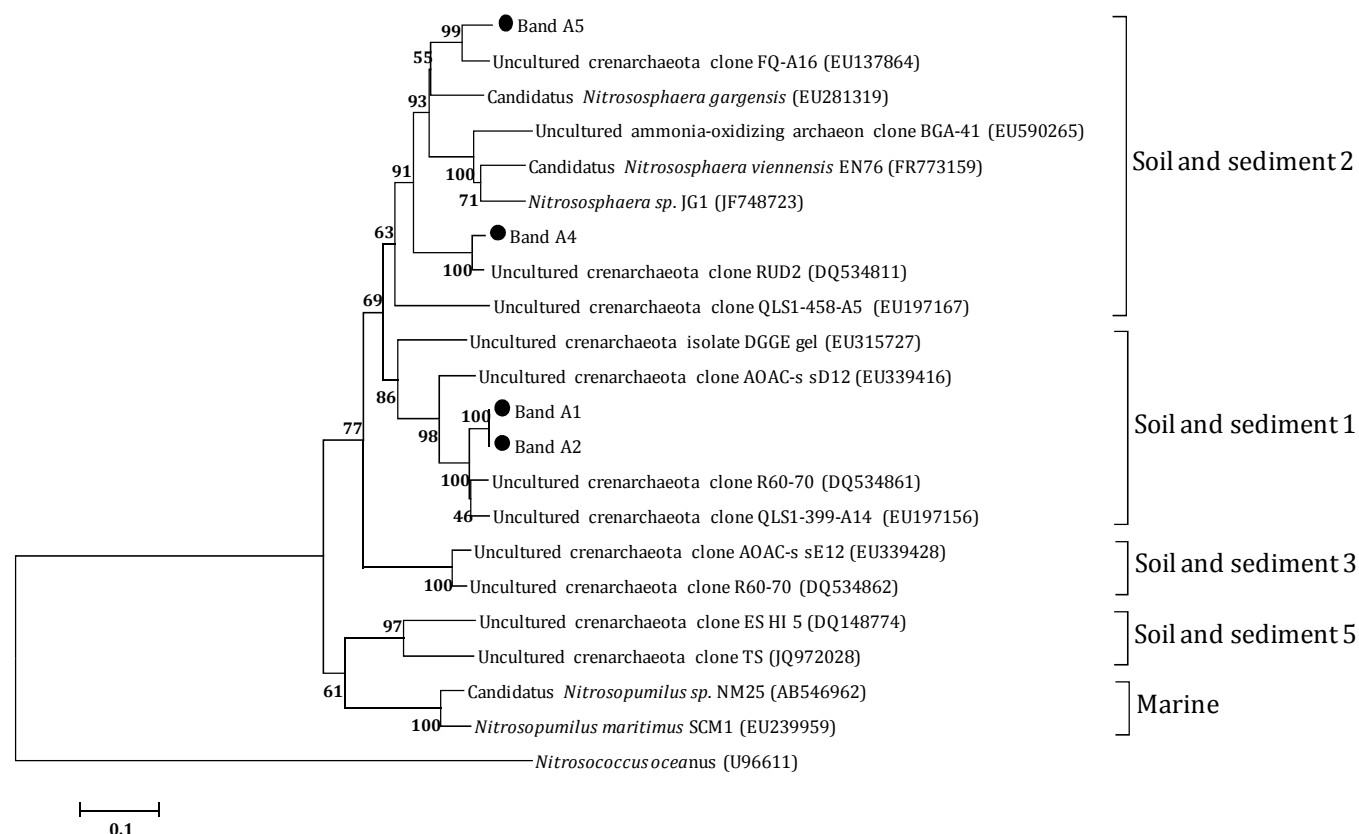


Fig. V. 9 Phylogenetic relationships achieved by a Neighbor-Joining tree based on archaeal *amoA* sequences (495bp). Values at the node indicate bootstrap percentage over 500 replicate trees. The bootstrap values (>50%) are indicated at branch points. The scale bar represents 0.1 fixed position mutations per nucleotide sequence position. The tree was rooted using *Nitrosococcus oceanus* (U96611) as an outgroup.

5. Discussion

The spatial and temporal dynamics of Berre lagoon communities were assessed under environmental perturbations. Differences in communities' distribution and activities in coastal systems are undoubtedly determined by the complex interplay of biological and environmental variables (Bernhard et al. 2005). These variables include differences in substrate affinity (e.g. for ammonia and oxygen), growth rates (Prosser 1989) and tolerance to varying salt and pH (Stehr et al. 1995, Bollmann & Laanbroek 2002). Additionally, hydrodynamic characteristics, such as river discharge and water residence times, may exert control on the microbial diversity (Bernhard et al. 2005). The microcosms designed for the experiment facilitated the assessment of the response of the communities to salinity fluctuations, under nearly natural, but controlled conditions.

A major problem looking for reasoning in ecological data is the design of plausible causal relationships between biological and environmental variables. The pattern of correlations between nitrification rates, structure of the community responsible of this process and fluctuations of salinity in conjunction with the exposition to different long-term in situ stresses was investigated by means of a combined use of Principal Component Analysis (PCA, Fig. V.10) and a Canonical Correlation Analysis (CCA, Fig. V.11), using data sets collected from microcosms where sediments with different historical saline stresses were submitted to various scenarios of salinity fluctuations.

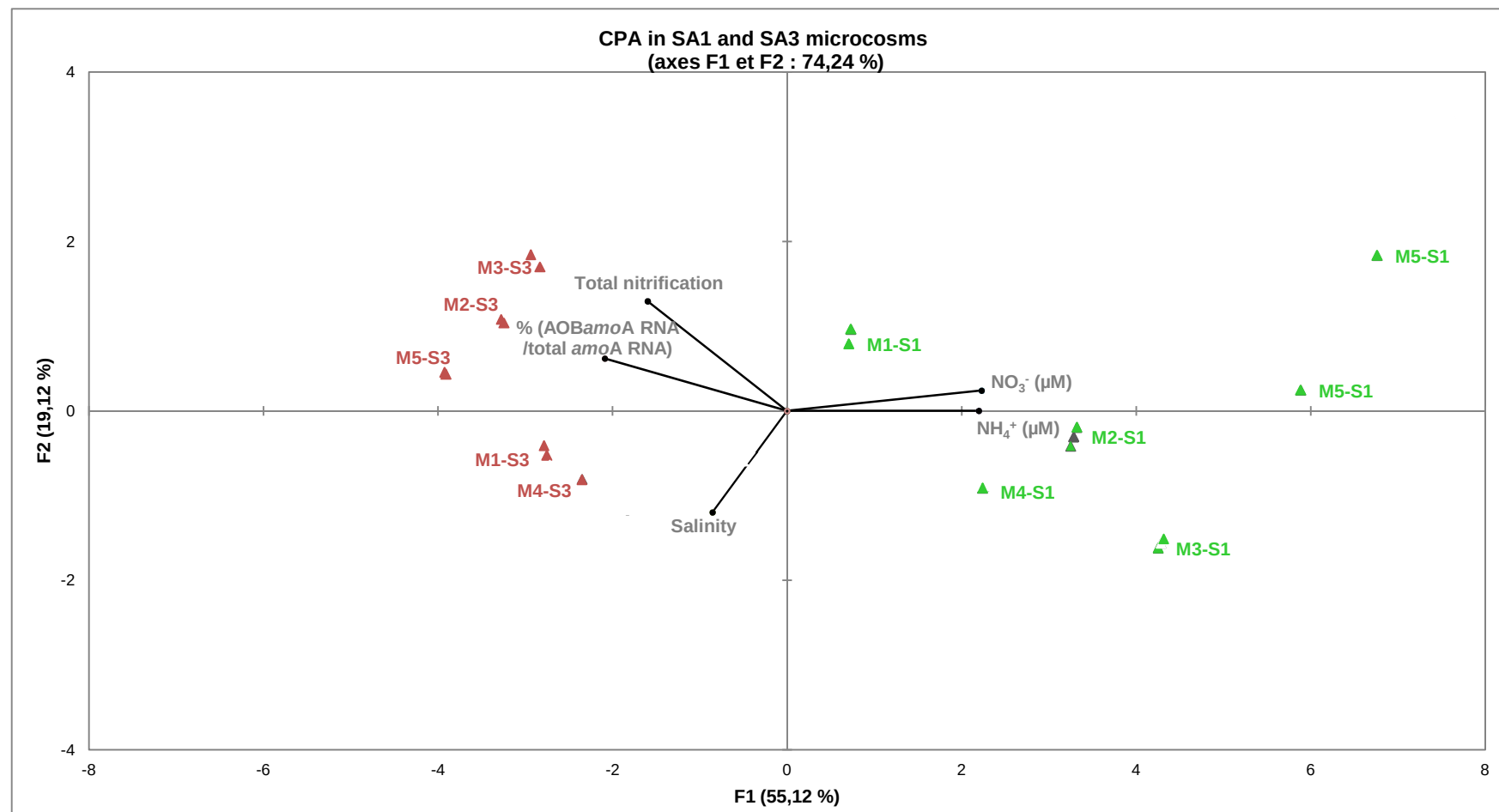


Fig. V. 10 Principle Components analysis (PCA) including SA1 and SA3 microcosms, total nitrification rates, some environmental parameters (salinity, $[\text{NO}_3^-]$, $[\text{NH}_4^+]$) and the percentage of AOB *amoA* RNA/total *amoA* RNA

Taking into account the *in situ* nitrate and ammonium concentrations, the total nitrification rates and transcript ratio *AOB amoA* / total *amoA* (Fig. V.10), PCA analysis shows that one axis explained 74.24% of the spatial repartition. As a large amounts of nitrate and ammonium come from the northern part of the lagoon, through rivers, $[\text{NO}_3^-]$ and $[\text{NH}_4^+]$ are higher in SA1 sediments which is consistent with the distribution of the microcosms (all SA1 microcosms being grouped) and higher total nitrification rates in SA3 than in SA1 (Fig. V.10). This goes along with the percentage of *AOB amoA* transcripts which was higher in SA3 microcosms (Fig. V.3, Fig. V.9).

To determine whether changes in salinity had an impact on the 16S rRNA gene and *amoA* communities, we explored the abundances and the diversity of these genes (Fig. V.4, V.5). The abundances of the prokaryotic communities were site-specific (SA1>SA3). This difference was also notice on the diversity level. This suggests functionally and actively distinct communities in these stations which have experienced different long term *in situ* stresses. By examining the community abundance in our microcosms and the nitrogen activities, our results showed an inverse relationship between the nitrification rates (SA1<SA3) (Fig. V.3) and the abundance of ammonia oxidizers (*amoA* gene) (SA1> SA3) (Table V.1). Discrepancy between nitrifying rates and the number of AO organisms has been reported for several studies (Bernhard et al. 2010). Bernhard et al. (2007) noticed site-specific differences in nitrification rates in relation with the community composition and abundances of AOB whereas as (Caffrey et al. 2007) found that potential nitrification rates increase as abundance of AOA *amoA* increased. In SA1 microcosms, AOA *amoA* were found more abundant than AOB counterparts, and this result is in agreement with several other studies (Leininger et al. 2006 , He et al. 2007, Tourna et al. 2008). However, in SA1 where salinity is lower than in SA3, AOB *amoA* transcripts were more abundant than AOA counterparts, in contrast with SA3.

CCA was used to analyze the relationships between the community structure and the nitrification rates in relation with salinity fluctuations (Fig. V.11). F1 and F2 axis corresponded, respectively to the stations and the effect of the salinity changes in the microcosms. In SA, which experienced frequent salinity variations, microcosms were tightly grouped indicating a minor effect of the saline stresses on sediment communities. Two “groups” could be then distinguished (Fig. V.11): the first one included the control M1S1, M2S1, M3S1 (subjected to only one salinity change) and M4S1 (with two fluctuations of a low magnitude), implying a resistance and or a resilience of these microcosms toward disturbances. The second “group” included M5S1 (with two successive high salinity fluctuations) which shifted from its steady state. Based on this spatial distribution, we can deduce that the SA1 microcosm communities were able to adapt more easily to salinity changes, except for M5S1 which stand out from the other microcosms. In contrast, for SA3, where long term saline conditions are more stable, a dichotomy between microcosms was observed (Fig. V.11); the first “groups” included M1S3 (control) and M4S3 (salinity fluctuation of low magnitude), suggesting resistance and/or a resilience of these microcosms to the salinity variations; the second “group” formed by M2S3, M3S3 and M5S3 (having undergone longer and/or higher saline stresses), was far from the first group (Fig. V.11), suggesting shifts in microcosm communities. This results indicated that passing a perturbation threshold (particularly the intensity of the disturbance), SA3 sediments shifted (as in M2S3, M3S3 and M5S3), whereas a resistance to disturbance was noticed for a short perturbation of low magnitude (as M4S3 which stayed close to the control state).

This ACC also brought some additional information about the ecology of some AO microorganisms. Those present in both stations were close to the inertia center and were showing a wide repartition regarding salinity. Among them A1, A2 and A5 bands corresponded to ubiquitous strains that are probably able to resist to salinity fluctuations. In M5S1, A5 band was more pronounced than in the other microcosms and a new band appeared (A4) implying that this strain would be favored under strong saline stresses. This increasing of diversity associated with salinity variations may be a consequence of an adaptation to marine salinity (Bernhard et al. 2005).

Sequences corresponding to the dominant phylotypes A1 and A2 belonged to soil and sediment *amoA* AOA cluster 1, whereas A4 and A5 belonged to cluster 2 (Nicol et al. 2008). Unfortunately, the bands that discriminated the different groups in this CCA *amoA* gene are minor bands in the DGGE gel and their sequencing failed.

6. Conclusion

Microorganisms are often restricted to particular ranges of environmental gradients, resulting in well-developed distribution patterns (Ysebaert et al. 2003, Bernhard et al. 2005). Our study has shown that long term stresses have induced the existence of different community in two stations of Berre Lagoon. These communities differed by their nitrifying activity, their overall and nitrifying structure specially the AOB ones. In contrast, AOA counterpart presented similar composition by DGGE. Furthermore, fluctuation of salinity did not seem to have a strong effect on AOA in contrast to AOB that reacted in a greater extend. Our results showed also that the impact of salinity fluctuations was still noticed 5 days after the return back to the initial salinity.

7. Acknowledgements

The authors are thankful to CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique), Aix Marseille Université, and Grants from the INSU -EC2CO – Microbien 2010 program and ANR Izoflux. I.Zaghmouri is granted by fellowship of the Tunisian Ministry of Education, Scientific Research and Technology.

8. References

- Beman JM, Francis CA (2006) Diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the sediments of a hypernutrified subtropical estuary: Bahía del To'bari, Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* 72:7767–7777
- Bernhard AE, Donn T, Giblin AE, Stahl DA (2005) Loss of diversity of ammonia-oxidizing bacteria correlates with increasing salinity in an estuary system. *Environmental Microbiology* 7:1289-1297
- Bernhard AE, Landry ZC, Blevins A, de la Torre JR, Giblin AE, Stahl DA (2010) Abundance of Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria along an Estuarine Salinity Gradient in Relation to Potential Nitrification Rates. *Applied and Environmental Microbiology* 76:1285–1289
- Bernhard AE, Tucker J, Giblin AE, D.A. S (2007) Functionally distinct communities of ammoniaoxidizing bacteria along an estuarine salinity gradient. *Environmental Microbiology* 9:1439-1447
- Bollmann A, Laanbroek HJ (2002) Influence of oxygen partial pressure and salinity on the community composition of ammonia-oxidizing bacteria in the Schelde Estuary. *Aquatic Microbial Ecology* 28:239-247
- Bonin P, Tamburini C, Michotey V (2002) Determination of the bacterial processes which are sources of nitrous oxide production in marine samples. *Water Research* 36:722-732
- Boynton WR, Kemp WM (1985) Nutrient Regeneration and Oxygen-Consumption by Sediments Along an Estuarine Salinity Gradient. *Marine Ecology-Progress Series* 23:45-55
- Caffrey JM, Bano N, Kalanetra K, Hollibaugh JT (2007) Ammoniaoxidation and ammonia-oxidizing bacteria and archaea from estuaries with differing histories of hypoxia. *ISME J* 1:660–662

- Casamayor EO, Massana R, Benlloch S, Ovreas L, Diez B, Goddard VJ, Gasol JM, Joint I, Rodriguez-Valera F, Pedros-Alio C (2002) Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environmental Microbiology* 4:338-348
- Cebbron A, Berthe T, Garnier J (2003) Nitrification and nitrifying bacteria in the lower Seine River and Estuary (France). *Applied and Environmental Microbiology* 69:7091-7100
- Coci M, Riechmann D, Bodelier PLE, Stefani S, Zwart G, Laanbroek HJ (2005) Effect of salinity on temporal and spatial dynamics of ammonia-oxidising bacteria from intertidal freshwater sediment. *Fems Microbiology Ecology* 53:359-368
- Dandie CE, Burtonb DL, Zebbartha BJ, Trevorsc JT, Goyera C (2007) Analysis of denitrification genes and comparison of nosZ, cnorB and 16S rDNA from culturable denitrifying bacteria in potato cropping systems. *Systematic and Applied Microbiology* 30:128-138
- Delpy F, Pagano M, Blanchot J, Carlotti F, Thibault-Botha D (2012) Man-induced hydrological changes, metazooplankton communities and invasive species in the Berre Lagoon (Mediterranean Sea, France). *Marine Pollution Bulletin* 64:1921-1932
- Francis CA, Roberts KJ, Beman MJ, Santoro AE, Oakley BB (2005) Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:14683-14688
- Goregues CM, Michotey VD, Bonin PC (2005) Molecular, biochemical, and physiological approaches for understanding the ecology of denitrification. *Microbial Ecology* 49:198-208
- He J-Z, Shen J-P, Zhang L-M, Zhu Y-G, Zheng Y-M, Xu M-G, Di H (2007) Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environmental Microbiology* 9:2364-2374

- Jackson CR, Langner HW, Donahoe-Christiansen J, Inskeep WP, McDermott TR (2001) Molecular analysis of microbial community structure in an arsenite-oxidizing acidic thermal spring. *Environmental Microbiology* 3:532-542
- Jantti H, Stange F, Leskinen E, Hietanen S (2011) Seasonal variation in nitrification and nitrate-reduction pathways in coastal sediments in the Gulf of Finland, Baltic Sea. *Aquatic Microbial Ecology* 63:171-181
- Kérouel R, Aminot A (1997) Fluorometric determination of ammonia in sea and estuarine waters by direct segmented flow analysis. . *Marine Chemistry* 57:265-275
- Könneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437:543-546
- Leininger S, Urich T, Schl  ter M, Schwark L, Qi J, Nicol GW (2006) Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442:806-809
- Michener CD, Sokal RR (1957) A quantitative approach to a problem in classification. *Evolution* 11:130-162
- Michotey V, Guasco S, Boeuf D, Morezzi N, Durieu B, Charpy L, Bonin P (2012) Spatio-temporal diversity of free-living and particle-attached prokaryotes in the tropical lagoon of Ahe atoll (Tuamotu Archipelago) and its surrounding oceanic waters *Marine Pollution Bulletin* 65:525-537
- Mosier AC, Francis CA (2008) Relative abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the San Francisco Bay estuary. *Environmental Microbiology* 10:3002-3016
- Nicol GW, Leininger S, Schleper C, Prosser JI (2008) The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environmental Microbiology* 10:2966-2978
- Nixon SW (1995) Coastal marine eutrophication: a definition, social causes and future concerns. *OPHELIA* 41:199-219

- Prosser JI (1989) Autotrophic nitrification bacteria. *Adv Microb Physiol* 30: 125–181.
- Purkhold U, Pommerening-Roser A, Juretschko S, Schmid MC, Koops H-P, Wagner M (2000) Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Applied Environmental Microbiology* 66:5368–5382.
- Rotthauwe JH, Witzel KP, Liesack W (1997) The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology* 63:4704-4712
- Rysgaard S, Thastum P, Dalsgaard T, Christensen PB, Sloth NP (1999) Effects of salinity on NH₄⁺ adsorption capacity, nitrification, and denitrification in Danish estuarine sediments. *Estuaries* 22:21-30
- Santoro AE, Francis CA, De Sieyes NR, Boehm AB (2008) Shifts in the relative abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across physicochemical gradients in a subterranean estuary. . *Environmental Microbiology* 10:1068–1079
- Scala DJ, Kerkhof LJ (1998) Nitrous oxide reductase (nosZ) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three nosZ genes from marine sediments. *Fems Microbiology Letters* 162:61-68
- Seitzinger SP (1988) Denitrification in Fresh-Water and Coastal Marine Ecosystems - Ecological and Geochemical Significance. *Limnology and Oceanography* 33:702-724
- Stehr G, Bottcher B, Dittberner P, Rath G, Koops HP (1995) The ammonia-oxidizing nitrifying population of the River Elbe Estuary. . *FEMS Microbial Ecology* 17:177–186
- Tourna M, Freitag TE, Nicol GW, Prosser JI (2008) Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. . *Environmental Microbiology* 10:1357–1364

- Treguer P, Le Corre P (1975) Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer. Université de Bretagne Occidentale
- Wuchter C, Abbas B, Coolen MJL, Herfort L, van Bleijswijk J, Timmers P, Strous M, Teira E, Herndl GJ, Middelburg JJ, Schouten S, Damste JSS (2006) Archaeal nitrification in the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:12317-12322
- Ysebaert T, Herman PMJ, Meire P, Craeymeersch J, Verbeek H, Heip CHR (2003) Large-scale patterns in estuaries: estuarine macrobenthic communities in the Schelde Estuary, NW Europe. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 57:335-355
- Zaghmouri I, Michotey VD, Guasco S, Raimbault P, Garcia N, Bernard G, Bonin PC (2013) Trends in salinity and inorganic nitrogen compounds in the Berre lagoon (1994-2011) bacterial activities and nitrogen budgets. *Marine Pollution Bulletin* 12

Chapitre VI

Conclusions et perspectives

Chapitre VI: Conclusions et Perspectives

1. Conclusions générales

L'étang de Berre, comme l'ensemble des lagunes côtières, est un écosystème dynamique et changeant. L'équilibre de cet écosystème dépend fortement des flux de nutriments et de matière organique qui stimulent le processus d'eutrophisation conduisant à une perte de diversité dans les communautés benthiques et phytoplanctoniques (Gouze et al. 2008). L'étang de Berre, la plus grande lagune méditerranéenne française, subit depuis plusieurs décennies de fortes pressions anthropiques et naturelles. Dans cet étang, doté d'une profondeur et d'une superficie importante, où la salinité devrait varier relativement lentement et dans une gamme étroite, nous constatons une situation radicalement opposée consécutive à des variations erratiques de la salinité dues aux rejets d'eau douce. Ces derniers proviennent: (1) des rivières Arc, Touloubre, Cadière (240 millions de m³ en 2008, 254 millions de m³ en 2009 et 238 millions de m³ en 2010), (2) des affluents pluviaux (100 millions de m³ en 2008, 125 millions de m³ en 2009 et 93 millions de m³ en 2010) et (3) de la Durance suite aux turbinages de la centrale hydroélectrique (EDF) de Saint Chamas (841 millions de m³ dans la saison 2007/2008, 997 millions de m³ en 2009 et 952 millions de m³ fin Novembre 2010).

Ainsi l'azote, sous forme minérale ou organique, arrive dans le milieu marin côtier apporté par les fleuves et rivières mais aussi par déposition atmosphérique (humide ou sèche). Les apports exogènes en N-NO₃⁻ ont été estimés à ~92 tonnes.an⁻¹ via les apports atmosphériques, ~506 tonnes.an⁻¹ via les rivières et ~30 tonnes.an⁻¹ via les apports d'eau de mer. En ce qui concerne les apports de N-NH₄⁺, les apports atmosphériques, des rivières et de la mer représentent respectivement ~39 tonnes.an⁻¹, 33 tonnes.an⁻¹ et ~11

tonnes.an⁻¹. De plus, ces zones côtières subissent des apports épisodiques mais importants de matière organique exogène (biogène ou anthropogène) et sont les lieux d'une production primaire élevée. Cette matière organique contient une fraction azotée composée de protéines, d'acides nucléiques, de glycoprotéines. Il est communément admis que les sédiments marins côtiers peu profonds (profondeur d'eau inférieure à 50 mètres) sont le siège d'une importante minéralisation de la matière organique en ammonium (NH₄⁺) par des micro-organismes hétérotrophes, aussi bien dans les couches oxiques qu'anoxiques du sédiment. Les principaux processus permettant l'élimination de l'azote en excès sont la dénitrification et la sédimentation. Dans une moindre mesure, d'autres pertes existent via des fuites gazeuses (provenant d'autres processus que la dénitrification tel que l'anammox) et les prélèvements de biomasse végétale ou animale.

Un suivi des activités potentielles du cycle de l'azote a été réalisé entre Avril 2010 et Avril 2011 dans des sédiments prélevés dans une station située au nord de l'étang (SA1), soumise à des apports d'eau douce et une station au sud (SA3), sous influence marine. Notre étude a ainsi permis de montrer que l'anammox est absente dans les sédiments de l'étang de Berre et les taux de dénitrification se situent dans la gamme la plus élevée rapportée dans la littérature (Seitzinger, 1988), faisant de ce processus un réel frein à l'eutrophisation de ce milieu côtier. D'autre part, la RDNA est de faible ampleur, comptant moins de 10% de la réduction du nitrate. Ce processus conduisant à la production d'ammonium joue donc un rôle minime dans le maintien de l'azote biodisponible pour la chaîne trophique dans cet écosystème. La forte disponibilité en ammonium issu de la minéralisation dans les sédiments est probablement à l'origine de la stimulation du processus de nitrification qui s'est révélée très active dans cet écosystème. Nous avons également montré que plus de 60 % du nitrate formé par

nitrification est dénitrifié, soulignant l'importance du couplage nitrification-dénitrification dans l'élimination de quantités considérables d'ammonium de l'écosystème (Lohse et al. 1993).

L'étang de Berre présente une forte production primaire dont la cause n'était pas déterminée au début de cette étude. Les budgets globaux d'ammonium et de nitrate ont été établis incluant à la fois nos données obtenues sur le compartiment sédimentaire au cours de cette étude et ceux de Gouze et al. sur la colonne d'eau (Gouze et al. 2008). Nous avons ainsi pu montrer que les processus de régénération dans le sédiment étaient actifs, et pourraient partiellement expliquer la forte production primaire enregistrée à l'étang de Berre. Les taux de régénération d'ammonium dans le sédiment se sont révélés relativement élevés comparés à ceux dans la colonne d'eau. La forte production primaire pélagique utilisant l'ammonium comme source d'azote pourrait être expliquée par les processus de régénération sédimentaire. En retour la sédimentation de ces proliférations phytoplanctoniques conduirait à l'accumulation du N-NH_4^+ dans le fond.

Par contre, les résultats de ces études semblent indiquer que les taux de régénération du nitrate dans le sédiment et la colonne d'eau ne permettent pas d'expliquer la demande pélagique en nitrate. Cette demande pélagique serait probablement soutenue par des apports extérieurs.

Il est reconnu que les lagunes côtières sont des écosystèmes complexes et hautement imprévisibles (de Wit et al. 2001.). Ces systèmes se caractérisent par une dépendance historique, des dynamiques non linéaires, des effets de seuil, des bassins attracteurs multiples et une prévisibilité limitée (Levin 2001, Folke et al. 2004). La dynamique des écosystèmes oscillent toujours, mais quelques perturbations sont plus importantes que d'autres. Les perturbations peuvent être le résultat de forces extrinsèques (par exemple,

des changements de salinité), des facteurs internes (par exemple, les changements de la communauté) ou d'une combinaison de causes (Carpenter et al. 2002). Quand une perturbation a lieu, un écosystème peut réagir de plusieurs manières: (1) Si la perturbation est faible, alors le système peut résister au changement. La résistance est l'intensité avec laquelle un système peut être perturbé à partir de son état de référence sans changement (Levin 2001, Levin & Lubchenco 2008). (2) Si la perturbation est plus importante et limitée dans le temps, le système peut faire preuve de résilience, c'est à dire, il peut retourner à son état initial en terme de fonctionnement après l'arrêt de la perturbation. Cela implique parfois une réorganisation des espèces montrant des redondances métaboliques (Holling, 1973, Folke et al. 2004, Walker et al. 2004). (3) Si la perturbation devient plus fréquente ou de plus forte intensité, l'écosystème peut partiellement se rétablir (Palumbi et al. 2008) ou subir de profonds changements conduisant à un autre état (changement de régime) (Folke et al. 2004, Palumbi et al. 2008). L'équilibre entre les taux de perturbation et de rétablissement est connu pour être un facteur important dans le maintien de la structure de la communauté et, par conséquent, dans le maintien des processus associés aux cycles biogéochimiques (Palumbi et al. 2008).

La salinité a été identifiée dans la littérature comme un paramètre influençant directement ou indirectement les activités associées au cycle de l'azote (Nielsen et al. 2001, Fear et al. 2005, Magalhaes et al. 2005). Nos résultats ont montré que les sédiments de l'étang de Berre issus de différentes localisations géographiques et ayant donc subi des historiques de fluctuations de salinité différentes présentaient des fonctionnements écologiques différents. Il nous est apparu important de développer une approche en microcosmes pour identifier plus en profondeur les mécanismes régissant le fonctionnement sédimentaire et analyser plus finement l'impact des

variations de salinité. La plupart des données publiées antérieurement rapportent des résultats obtenus *in situ* à partir d'études de terrain dans lesquelles les variations de salinité sont généralement accompagnées par des changements simultanés de nombreux autres paramètres tels que les nitrates ou la teneur en matière organique. Dans cette étude, l'impact des fluctuations de salinité a été testé expérimentalement en microcosmes, en ne variant qu'un seul paramètre. Nous avons ainsi évalué la sensibilité des processus de l'azote (résilience et résistance) aux changements de salinité à court terme dans des échantillons de stations de sédiment de l'étang de Berre présentant des paramètres physicochimiques semblables (concentrations d'azote inorganique, LOI%), mais des historiques de fluctuations de la salinité très contrastés.

Dans l'ensemble, quels que soient les scénarios de fluctuations de salinité testés, les taux de dénitrification, de nitrate réduction et de nitrification étaient plus élevés dans la station sous influence marine (SA3) que dans la station soumise à des apports d'eau douce (SA1). Par ailleurs, les réponses des communautés dénitrifiantes et nitrate réductrices ont été différentes à travers leurs taux d'activité en fonction de la station. Les taux de dénitrification et de nitrate réduction sont restés constants en SA3 quel que soit le scénario. En revanche pour SA1, la modification de la salinité a induit une augmentation des taux d'activité. Ce résultat suggère que face aux fluctuations de la salinité, la résistance des communautés dénitrifiantes et nitrate réductrices de SA3 était supérieure à celle des communautés présentes à SA1. En ce qui concerne la nitrification, le premier stress halin n'a pas induit de changement dans les taux quelle que soit la station par contre des modifications ont été observées par la suite. L'ensemble de ces résultats a montré que face à des perturbations de même nature (fluctuations de la salinité), les deux stations présentent des réponses différentes, suggérant que les stress halins à long terme influencent les réponses à court terme. Une hypothèse serait que la

diversité à la station SA3 (zone permissive, avec de basses fréquences de changement de salinité) soit supérieure à celle dans SA1 (zone sélective, avec de hautes fréquences de changement de salinité). Le degré élevé de diversité phylogénétique parmi les communautés dénitrifiantes et nitrate réductrices, pourraient leur permettre d'abriter dans les sédiments, des communautés présentant une forte redondance fonctionnelle et ainsi de maintenir un taux d'activité et de revenir à l'état initial (on parle donc de résilience). Nous avons montré que la nitrification présente une plus faible capacité de résilience comparée à la dénitrification et à la NaR. Il est probable que la plus faible diversité phylogénique apparente de ces organismes ne leur permet pas d'abriter une telle redondance.

Les organismes nitrifiants sont difficilement cultivables et peu d'étude physiologique permettent d'analyser l'impact des paramètres physico-chimiques sur leur activité ou leur développement.

Afin d'appréhender la réponse des communautés nitrifiantes face aux variations de salinité, nous avons décidé de nous focaliser sur la structure de la communauté nitrifiante dans les différents microcosmes et plus particulièrement sur les procaryotes nitrifiants. L'abondance des communautés procaryotiques est spécifique au site (SA1>SA3) de même que celles des AOA et AOB. Cette dichotomie entre station a été également observée au niveau de la diversité par les approches de DGGE. La différence de diversité des communautés AO entre les stations ou les microcosmes est essentiellement due aux bandes de faible intensité observées en DGGE. Les bandes majoritaires sont communes à la plupart des microcosmes. Si aucune relation n'a été observée entre le nombre de gène *amoA* et l'activité de nitrification, une relation significative a pu être mise en évidence entre l'abondance relative (par rapport au microcosme témoin, M1) des transcrits *amoA* archéens (AOA) et bactériens (AOB) et

l'activité relative déterminée par la méthode isotopique. L'absence de relation entre les taux de nitrification et le nombre d'organismes AO a été rapportée par plusieurs études (Bernhard et al. 2010). Les AOA se sont révélés beaucoup plus abondants que les AOB dans toutes les stations et cette prédominance a perduré quel que soit le scénario. Ce résultat est en accord avec plusieurs autres études (Leininger et al. 2006, He et al. 2007, Tourna et al. 2008). Cependant de manière surprenante, la prédominance des AOA n'a pas été retrouvée au niveau des transcrits. Les transcrits AOB *amoA* dominent à la station SA1, alors que les AOA *amoA* dominent à la station SA3. Les variations de salinité ont provoqué une augmentation des transcrits AOA *amoA* à la station SA1 alors que la baisse de salinité à la station SA3 a induit une diminution des transcrits AOA *amoA*. Les communautés des nitrifiants actifs sont donc différentes suivant les stations.

Au niveau de la diversité des AO, la station SA1 soumise à des fluctuations fréquentes de salinité, s'est révélée être plus résistante à court terme aux changements de salinité que la station SA3 dont les sédiments sont sous influence marine et peu impactés par des changements de salinité *in situ*. Nos résultats ont également montré que lorsqu'il y a des perturbations, ces dernières perdurent pendant plusieurs jours (au moins 5 jours) après le retour aux conditions initiales.

Par conséquent, les différences dans la structure des communautés microbiennes actives en termes d'effectif et de diversité dépendent fortement des interactions complexes entre les facteurs biologiques et environnementaux à court terme mais également de l'historique des stress passés à long terme.

2. Perspectives

Ce travail de thèse s'inscrit dans une problématique plus large dans le but d'améliorer l'état des connaissances du cycle de l'azote en termes de bilan et de processus. Leur traduction en termes opérationnels pourrait permettre d'intensifier les mesures de lutte contre l'eutrophisation de l'étang de Berre.

Cette étude a été focalisée sur le cycle de l'azote, le cycle du phosphore n'a pas été pris en compte. Cependant, P est un élément essentiel de la régulation de l'eutrophisation. D'autre part, les interactions entre les cycles de l'azote et du soufre n'ont pas été intégrées dans cette étude. Il est important de signaler que les différentes formes du soufre pourraient agir sur les activités du cycle de l'azote, notamment sur la nitrification qui pourrait être ralentie voire inhibée. Une étude plus complète, intégrant les trois cycles biogéochimiques est souhaitable car elle pourrait donner une idée plus globale de leur importance dans l'état d'eutrophisation de l'étang de Berre.

Nous avons également essayé d'établir les budgets d'azote dans les sédiments et la colonne d'eau afin d'expliquer la forte production primaire observée. Dans cette étude, nous sommes parvenus à l'expliquer partiellement. Une étude plus approfondie sur les dépôts atmosphériques, les entrées d'eau marine ou encore la mort et la dégradation des organismes benthiques devrait être prise en compte dans les études à venir.

Afin de mieux comprendre l'impact direct des fluctuations de la salinité sur les activités du cycle de l'azote, nous avons réalisé une approche en microcosmes dans lesquels, seule la salinité a varié. Il serait particulièrement intéressant de renouveler cette expérimentation en modifiant les apports en nitrate ou en combinant ces 2 paramètres. Détecter lorsqu'un écosystème est loin de son état d'équilibre exige souvent des

données à long terme en raison de la lenteur des cycles « perturbation-rétablissement », et seules les données à long terme pourront révéler les types de variation de l'écosystème (Palumbi et al. 2008). L'échelle temporelle de l'étude devra être prise en compte afin de ne pas affecter les jugements sur la stabilité ou la persistance des communautés.

Le troisième volet de cette thèse concerne l'étude de la dynamique des communautés nitrifiantes et la nitrification suite aux fluctuations de salinité. Il aurait été intéressant d'inclure également la comparaison des profils génétiques aux profils transcriptionnels afin de définir les microorganismes actifs dans nos sédiments. L'étude des autres gènes de fonction impliqués dans les activités de dénitrification et de nitrate réduction (*nosZ*, *narG*, *napA*...), leur abondance et leur diversité suite à des perturbations de la salinité pourraient donner une information plus complète sur la structure et le fonctionnement de ces communautés microbiennes. Une approche de pyroséquençage permettrait d'atteindre un degré résolutif plus poussé car elle fournit un nombre de séquences plus élevé que celui obtenu par une méthode de séquençage classique.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Allison SD, Martiny JBH (2008) Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *P Natl Acad Sci USA* 105:11512-11519

B

Baho DL, Peter H, Tranvik LJ (2012) Resistance and resilience of microbial communities - temporal and spatial insurance against perturbations. *Environmental Microbiology* 14:2283-2292

Barnes J, Owens NJP (1998) Denitrification and nitrous oxide concentrations in the humber estuary, UK, and adjacent coastal zones. *Marine Pollution Bulletin* 37:247-260

Bellwood DR, Hughes TP, Folke C, Nystriim M (2004) Confronting the coral reef crisis. *Nature* 429:827-833

Beman JM, Francis CA (2006) Diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the sediments of a hypernutrified subtropical estuary: Bahía del To'bari, Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* 72:7767-7777

Bernasconi C, Campostrini P, De Roo A, George A-S, Heiskanen J, Hjorth N, Hoepffner KC, Jones P, Noges N, Pirrone N, Runnalls F, Somma N, Stilanakis G, Umlauf W, van de Bund P, Viaroli J, Zaldivar J-M (2005) Climate Change and the European Water Dimension.

Bernhard AE, Donn T, Giblin AE, Stahl DA (2005) Loss of diversity of ammonia-oxidizing bacteria correlates with increasing salinity in an estuary system. *Environmental Microbiology* 7:1289-1297

Bernhard AE, Landry ZC, Blevins A, de la Torre JR, Giblin AE, Stahl DA (2010) Abundance of Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria along an Estuarine Salinity Gradient

- in Relation to Potential Nitrification Rates Applied and Environmental Microbiology 76:1285-1289
- Bernhard AE, Tucker J, Giblin AE, D.A. S (2007a) Functionally distinct communities of ammoniaoxidizing bacteria along an estuarine salinity gradient. Environmental Microbiology 9:1439-1447
- Bernhard AE, Tucker J, Giblin AE, Stahl DA (2007b) Functionally distinct communities of ammoniaoxidizing bacteria along an estuarine salinity gradient. Environmental Microbiology 9:1439-1447
- Binnerup SJ, Jensen K, Revsbech NP, Jensen MH, Sorensen J (1992) Denitrification, Dissimilatory Reduction of Nitrate to Ammonium, and Nitrification in a Bioturbated Estuarine Sediment as Measured with N-15 and Microsensor Techniques. Appl Environ Microb 58:303-313
- Blackburn TH, Henriksen K (1983) Nitrogen Cycling in Different Types of Sediments from Danish Waters. Limnol Oceanogr 28:477-493
- Bollmann A, Laanbroek HJ (2002) Influence of oxygen partial pressure and salinity on the community composition of ammonia-oxidizing bacteria in the Schelde Estuary. Aquatic Microbial Ecology 28:239-247
- Bonin P (1996) Anaerobic nitrate reduction to ammonium in two strains isolated from costal marine sediment: A dissimilatory pathway. Fems Microbiology Ecology 19:27-38
- Bonin P (2000) Le cycle de l'azote dans les écosystèmes marins côtiers. Oceanis 26:697-710
- Bonin P, Gilewicz M (1991) A Direct Demonstration of Co-Respiration of Oxygen and Nitrogen-Oxides by Pseudomonas-Nautica - Some Spectral and Kinetic-Properties of the Respiratory Components. Fems Microbiology Letters 80:183-188
- Bonin P, Omnes P, Chalamet A (1998) Simultaneous occurrence of denitrification and nitrate ammonification in sediments of the french mediterranean coast. Hydrobiologia 389:169-182

- Bonin P, Tamburini C, Michotey V (2002) Determination of the bacterial processes which are sources of nitrous oxide production in marine samples. *Water Research* 36:722-732
- Bowen JL, Ward BB, Morrison HG, Hobbie JE, Valiela I, Deegan LA, Sogin ML (2011) Microbial community composition in sediments resists perturbation by nutrient enrichment. *Isme J* 5:1540-1548
- Boynton WR, Kemp WM (1985) Nutrient Regeneration and Oxygen-Consumption by Sediments Along an Estuarine Salinity Gradient. *Marine Ecology-Progress Series* 23:45-55
- Braker G, Zhou JZ, Wu LY, Devol AH, Tiedje JM (2000) Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific northwest marine sediment communities. *Appl Environ Microb* 66:2096-2104
- Brooks PD, Stark JM, McInteer BB, Preston T (1989) Diffusion Method to Prepare Soil Extracts for Automated N-15 Analysis. *Soil Sci Soc Am J* 53:1707-1711
- Byrne N, Strous M, Crepeau V, Kartal B, Birrien JL, Schmid M, Lesongeur F, Schouten S, Jaeschke A, Jetten M, Prieur D, Godfroy A (2009) Presence and activity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria at deep-sea hydrothermal vents. *Isme J* 3:117-123

C

- Caffrey JM, Bano N, Kalanetra K, Hollibaugh JT (2007) Ammoniaoxidation and ammonia-oxidizing bacteria and archaea from estuaries with differing histories of hypoxia. . *ISME J* 1:660-662
- Campos JL, Mosquera-Corral A, Sanchez M, Mendez R, Lema JM (2002) Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in an activated sludge unit. *Water Research* 36:2555-2560

- Canfield DE (2005) The Nitrogen cycle. In: Elsevier (ed) *Advances in marine biology*, Book 48
- Capone DG (2000) The marine microbial nitrogen cycle. In: D.L. K (ed) *Microbian ecology of the oceans*. Wiley-liss, New York
- Carpenter WS, Lee BC, Gunderson PD, Stueland DT (2002) Assessment of personal protective equipment use among Midwestern farmers. *Am J Ind Med* 42:236-247
- Casamayor EO, Massana R, Benlloch S, Ovreas L, Diez B, Goddard VJ, Gasol JM, Joint I, Rodriguez-Valera F, Pedros-Alio C (2002) Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environmental Microbiology* 4:338-348
- Castel J, Caumette P, Herbert R (1996) Eutrophication gradients in coastal lagoons as exemplified by the Bassin d'Arcachon and the Etang du Prevost. *Hydrobiologia* 329:R9-R28
- Castignetti D, Hollocher TC (1984) Heterotrophic Nitrification among Denitrifiers. *Appl Environ Microb* 47:620-623
- Cebon A, Berthe T, Garnier J (2003) Nitrification and nitrifying bacteria in the lower Seine River and Estuary (France). *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 69:7091-7100
- Cépralmar, Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée & Corse RL-R, l'Aude Dd, l'Hérault Dd, Pyrénées-Orientales Dd (2006) Défi « eutrophisation des lagunes littorales du Languedoc-Roussillon ». Etude réalisée dans le cadre du 8ème programme de l'Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée & Corse.
- Chapin FS, Sala OE, Burke IC, Grime JP, Hooper DU, Lauenroth WK, Lombard A, Mooney HA, Mosier AR, Naeem S, Pacala SW, Roy J, Steffen WL, Tilman D (1998) Ecosystem consequences of changing biodiversity - Experimental evidence and a research agenda for the future. *Bioscience* 48:45-52

- Chapin FS, Zavaleta ES, Eviner VT, Naylor RL, Vitousek PM, Reynolds HL, Hooper DU, Lavorel S, Sala OE, Hobbie SE, Mack MC, Diaz S (2000) Consequences of changing biodiversity. *Nature* 405:234-242
- Cloern JE (2001) Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Marine Ecology-Progress Series* 210:223-253
- Coci M, Riechmann D, Bodelier PLE, Stefani S, Zwart G, Laanbroek HJ (2005) Effect of salinity on temporal and spatial dynamics of ammonia-oxidising bacteria from intertidal freshwater sediment. *Fems Microbiology Ecology* 53:359-368
- Codispoti LA, Christensen JP (1985) Nitrification, Denitrification and Nitrous-Oxide Cycling in the Eastern Tropical South-Pacific Ocean. *Marine Chemistry* 16:277-300
- Conrad R (1996) Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiological Reviews* 60:609-+
- Cornwell JC, Kemp WM, Kana TM (1999) Denitrification in coastal ecosystems: methods, environmental controls, and ecosystem level controls, a review. *Aquatic Ecology* 33:41-54
- Cowan JLW, Boynton WR (1996) Sediment-Water Oxygen and Nutrient Exchanges Along the Longitudinal Axis of Chesapeake Bay: Seasonal Patterns, Controlling Factors and Ecological Significance. *Estuaries* 19:562-580
- Crossland CJ, Kremer HH, Lindeboom HJ, Crossland JI, Le Tissier MDA (2005) Coastal Fluxes in the Anthropocene. The Land-Ocean Interactions in the Coastal Zone Project of the International Geosphere – Biosphere Programme. *Global Change - The IGBP Springer*

D

- Dalsgaard T, Canfield DE, Petersen J, Thamdrup B, Acuna-Gonzalez J (2003) N₂ production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. *Nature* 422:606-608
- Dalsgaard T, Thamdrup B, Canfield DE (2005) Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in the marine environment. *Research in Microbiology* 156:457-464
- Dandie CE, Burtonb DL, Zebbartha BJ, Trevorsc JT, Goyera C (2007) Analysis of denitrification genes and comparison of nosZ, cnorB and 16S rDNA from culturable denitrifying bacteria in potato cropping systems. *Systematic and Applied Microbiology* 30:128-138
- de Wit R, Stal LJ, Lomstein BA, Herbert RA, Van Gernerden H, Viaroli P, Ceccherelli VU, Rodriguez-Valera F, Bartoli M, Giordani G, Azzoni R, Schaub B, Welsh DT, Donnelly A, Cifuentes A, Anton J, Finster K, Nielsen LB, Underlien Pedersen A-E, Turi Neubauer A, Colangelo M, Heijs SK (2001.) ROBUST: the role of buffering capacities in stabilising coastal lagoon ecosystems. . *Continental Shelf Research* 21:2021-2041
- Deborde J, Anschutz P, Auby I, Gle C, Commarieu MV, Maurer D, Lecroart P, Abril G (2008) Role of tidal pumping on nutrient cycling in a temperate lagoon (Arcachon Bay, France). *Marine Chemistry* 109:98-114
- Delpy F, Pagano M, Blanchot J, Carlotti F, Thibault-Botha D (2012a) Man-induced hydrological changes, metazooplankton communities and invasive species in the Berre Lagoon (Mediterranean Sea, France). *Marine Pollution Bulletin* 64:1921-1932
- Delpy F, Pagano M, Blanchot J, Carlotti F, Thibault-Botha D (2012b) Man-induced hydrological changes, metazooplankton communities and invasive species in the Berre Lagoon (Mediterranean Sea, France). . *Marine Pollution Bulletin* 64:1921-1932

- Desnues C, Michotey VD, Wieland A, Zhizang C, Fourcans A, Duran R, Bonin PC (2007) Seasonal and diel distributions of denitrifying and bacterial communities in a hypersaline microbial mat (Camargue, France). *Water Research* 41:3407-3419
- Dong LF, Smith CJ, Papaspyrou S, Stott A, Osborn AM, Nedwell DB (2009) Changes in Benthic Denitrification, Nitrate Ammonification, and Anammox Process Rates and Nitrate and Nitrite Reductase Gene Abundances along an Estuarine Nutrient Gradient (the Colne Estuary, United Kingdom). *Appl Environ Microb* 75:3171-3179
- Dong LF, Thornton DCO, Nedwell DB, Underwood GJC (2000) Denitrification in sediments of the River Colne estuary, England. *Marine Ecology-Progress Series* 203:109-122
- Duffy JE (2002) Biodiversity and ecosystem function: the consumer connection. *Oikos* 99:201-219
- Dugdale RC (1986) Citation-Classic - Uptake of New and Regenerated Forms of Nitrogen in Primary Productivity. *Cc/Agr Biol Environ*:14-14

E

- Elmqvist T, Folke C, Nystrom M, Peterson G, Bengtsson J, Walker B, Norberg J (2003) Response diversity, ecosystem change, and resilience. *Front Ecol Environ* 1:488-494
- Engstrom P, Dalsgaard T, Hulth S, Aller RC (2005) Anaerobic ammonium oxidation by nitrite (anammox): Implications for N₂ production in coastal marine sediments. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 69:2057-2065
- Eyre BD, Ferguson AJP (2002) Comparison of carbon production and decomposition, benthic nutrient fluxes and denitrification in seagrass, phytoplankton, benthic microalgae- and macroalgae-dominated warm-temperate Australian lagoons. *Marine Ecology-Progress Series* 229:43-59

F

- Fear JM, Thompson SP, Gallo TE, Paerl HW (2005) Denitrification rates measured along a salinity gradient in the eutrophic Neuse River Estuary, North Carolina, USA. *Estuaries* 28:608-619
- Fisher SG, Lerman LS (1979) Length-independant separation of DNA restriction fragments in two dimensional gel electrophoresis. *Cell* 16:191-200
- Focht, Verstraete (1977) Biochemical ecology of nitrification and denitrification. *Advances in Microbial Ecology* 1:135-214
- Folke C, Carpenter S, Walker B, Scheffer M, Elmqvist T, Gunderson L, Holling CS (2004) Regime shifts, resilience, and biodiversity in ecosystem management. *Annu Rev Ecol Evol S* 35:557-581
- Fong P, Boyer KE, Desmond JS, Zedler JB (1996) Salinity stress, nitrogen competition, and facilitation what controls seasonal succession of two opportunistic green macroalgae? *J Exp Mar Biol Ecol* 206:203-221
- Forsberg C (1989) Importance of Sediments in Understanding Nutrient Cyclings in Lakes. *Hydrobiologia* 176:263-277
- Francis CA, Beman JM, Kuypers MMM (2007) New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *Isme J* 1:19-27
- Francis CA, Roberts KJ, Beman MJ, Santoro AE, Oakley BB (2005) Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:14683–14688
- Frost TM, Carpenter SR, Ives AR, Kratz TK (1995) Species compensation and complementarity in ecosystem function. In: JH JCaL (ed) *Linking species and ecosystems* New York: Chapman & Hall.

G

- Galloway JN, Aber JD, Erisman JW, Seitzinger SP, Howarth RW, Cowling EB, Cosby BJ (2003) The nitrogen cascade. *Bioscience* 53:341-356
- Gardner WS, McCarthy MJ (2009) Nitrogen dynamics at the sediment-water interface in shallow, sub-tropical Florida Bay: why denitrification efficiency may decrease with increased eutrophication. *Biogeochemistry* 95:185-198
- Gardner WS, McCarthy MJ, An SM, Sobolev D, Sell KS, Brock D (2006) Nitrogen fixation and dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) support nitrogen dynamics in Texas estuaries. *Limnol Oceanogr* 51:558-568
- Gattuso JP, Frankignoulle M, Wollast R (1998) Carbon and carbonate metabolism in coastal aquatic ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29:405-434
- Giblin AE, Hopkinson CS, Tucker J (1997) Benthic metabolism and nutrient cycling in Boston Harbor, Massachusetts. *Estuaries* 20:346-364
- Giblin AE, Weston NB, Banta GT, Tucker J, Hopkinson CS (2010) The Effects of Salinity on Nitrogen Losses from an Oligohaline Estuarine Sediment. *Estuar Coast* 33:1054-1068
- Gilbert F, Bonin P, Stora G (1995) Effect of Bioturbation on Denitrification in a Marine Sediment from the West Mediterranean Littoral. *Hydrobiologia* 304:49-58
- Gilbert F, Souchu P, Bianchi M, Bonin P (1997) Influence of shellfish farming activities on nitrification, nitrate reduction to ammonium and denitrification at the water-sediment interface of the Thau lagoon, France. *Marine Ecology-Progress Series* 151:143-153
- GIPREB Odm (2010) Etang de Berre Suivi écologique du milieu Rapport de synthèse 2009-2010.

- Glibert PM, Lipschultz F, Mccarthy JJ, Altabet MA (1982) Isotope-Dilution Models of Uptake and Remineralization of Ammonium by Marine Plankton. *Limnol Oceanogr* 27:639-650
- Goregues CM, Michotey VD, Bonin PC (2005) Molecular, biochemical, and physiological approaches for understanding the ecology of denitrification. *Microbial Ecology* 49:198-208
- Gouze E, Raimbault P, Garcia N, Bernard G, Picon P (2008a) Nutrient and suspended matter discharge by tributaries into the Berre Lagoon (France): The contribution of flood events to the matter budget. *Cr Geosci* 340:233-244
- Gouze E, Raimbault P, Garcia N, Picon P (2008b) Nutrient dynamics and primary production in the eutrophic Berre Lagoon (Mediterranean, France). *Transitional Waters Bulletin* 2:17-40
- Gruber N (2008) The Marine Nitrogen Cycle: Overview and Challenges. In: Capone DG, Bronk DA, Mulholland MR, Carpenter EJ (eds) *Nitrogen in the Marine Environment* (2nd Edition). Elsevier
- Gunderson LH, Holling CS, Pritchard L, Peterson GD (2002) Resilience of large-scale resource systems. *Scope Ser* 60:3-20

H

- Hamersley MR, Lavik G, Woebken D, Rattray JE, Lam P, Hopmans EC, Damste JSS, Kruger S, Graco M, Gutierrez D, Kuypers MMM (2007) Anaerobic ammonium oxidation in the Peruvian oxygen minimum zone. *Limnol Oceanogr* 52:923-933
- He J-Z, Shen J-P, Zhang L-M, Zhu Y-G, Zheng Y-M, Xu M-G, Di H (2007) Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environmental Microbiology* 9:2364-2374

- Heiss B, Frunzke K, Zumft WG (1989) Formation of the N-N-Bond from Nitric-Oxide by a Membrane-Bound Cytochrome Bc Complex of Nitrate-Respiring (Denitrifying) *Pseudomonas-Stutzeri*. *Journal of Bacteriology* 171:3288-3297
- Herbert RA (1999) Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *Fems Microbiology Reviews* 23:563-590
- Hietanen S, Kuparinen J (2008) Seasonal and short-term variation in denitrification and anammox at a coastal station on the Gulf of Finland, Baltic Sea. *Hydrobiologia* 596:67-77
- Holling CS (1973) Resilience and stability of ecological systems. . *Annual Review of Ecology and Systematics* 4:1-23
- Hopkinson CS, Giblin AE, Tucker J, Garritt RH (1999) Benthic metabolism and nutrient cycling along an estuarine salinity gradient. *Estuaries* 22:863-881
- Horner-Devine MC, Martiny AC (2008) Biogeochemistry - News about nitrogen. *Science* 320:757-758
- Howarth R, Chan F, Conley DJ, Garnier J, Doney SC, Marino R, Billen G (2011) Coupled biogeochemical cycles: eutrophication and hypoxia in temperate estuaries and coastal marine ecosystems. *Front Ecol Environ* 9:18-26
- Howarth RW, Billen G, Swaney D, Townsend A, Jaworski N, Lajtha K, Downing JA, Elmgren R, Caraco N, Jordan T, Berendse F, Freney J, Kudeyarov V, Murdoch P, Zhu ZL (1996) Regional nitrogen budgets and riverine N&P fluxes for the drainages to the North Atlantic Ocean: Natural and human influences. *Biogeochemistry* 35:75-139
- Howarth RW, Marino R (2006) Nitrogen as the limiting nutrient for eutrophication in coastal marine ecosystems: Evolving views over three decades. *Limnol Oceanogr* 51:364-376
- Hulth S, Aller RC, Gilbert F (1999) Coupled anoxic nitrification/manganese reduction in marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 63:49-66

J

- Jackson CR, Churchill PF, Roden EE (2001a) Successional changes in bacterial assemblage structure during epilithic biofilm development. *Ecology* 82:555-566
- Jackson CR, Langner HW, Donahoe-Christiansen J, Inskeep WP, McDermott TR (2001b) Molecular analysis of microbial community structure in an arsenite-oxidizing acidic thermal spring. *Environmental Microbiology* 3:532-542
- Jackson CR, Vallaire SC (2009) Effects of Salinity and Nutrients on Microbial Assemblages in Louisiana Wetland Sediments. *Wetlands* 29:277-287
- Jaeschke A, Rooks C, Trimmer M, Nicholls JC, Hopmans EC, Schouten S, Damste JSS (2009) Comparison of ladderane phospholipid and core lipids as indicators for anaerobic ammonium oxidation (anammox) in marine sediments. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 73:2077-2088
- Jantti H, Hietanen S (2012) The Effects of Hypoxia on Sediment Nitrogen Cycling in the Baltic Sea. *Ambio* 41:161-169
- Jantti H, Stange F, Leskinen E, Hietanen S (2011) Seasonal variation in nitrification and nitrate-reduction pathways in coastal sediments in the Gulf of Finland, Baltic Sea. *Aquatic Microbial Ecology* 63:171-181
- Javanaud C, Michotey V, Guasco S, Garcia N, Anschutz P, Canton M, Bonin P (2011) Anaerobic ammonium oxidation mediated by Mn-oxides: From sediment to strain level. *Research in Microbiology* doi:10.1016/j.resmic.2011.01.011
- Jenkins MC, Kemp WM (1984) The Coupling of Nitrification and Denitrification in 2 Estuarine Sediments. *Limnol Oceanogr* 29:609-619
- Jensen K, Revsbech NP, Nielsen LP (1993) Microscale Distribution of Nitrification Activity in Sediment Determined with a Shielded Microsensor for Nitrate. *Appl Environ Microb* 59:3287-3296

- Jensen KM, Jensen MH, Kristensen E (1996) Nitrification and denitrification in Wadden Sea sediments (Konigshafen, Island of Sylt, Germany) as measured by nitrogen isotope pairing and isotope dilution. *Aquatic Microbial Ecology* 11:181-191
- Jetten M, Strous M, van de Pas-Schoonen KT, Schalk J, van Dongen U, van de Graaf A, Logemann S, Muyzer G, Van Loosdrecht M, Kuenen G (1998) The anaerobic oxidation of ammonium. *Fems Microbiology Reviews* 22:421-437
- Jetten MSM, Wagner M, Fuerst J, van Loosdrecht M, Kuenen G, Strous M (2001) Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ('anammox') process. *Current Opinion in Biotechnology* 12:283-288

K

- Kartal B, Rattray J, van Niftrik LA, van de Vossenberg J, Schmid MC, Webb RI, Schouten S, Fuerst JA, Damste JSS, Jetten MSM, Strous M (2007) Candidatus "Anammoxoglobus propionicus" a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 30:39-49
- Kérouel R, Aminot A (1997) Fluorometric determination of ammonia in sea and estuarine waters by direct segmented flow analysis *Marine Chemistry* 57:265-275
- Kérouel R, Aminot A (1997) Fluorometric determination of ammonia in sea and estuarine waters by direct segmented flow analysis. . *Marine Chemistry* 57:265-275
- Könneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437:543-546
- Koops HP, Bottcher B, Moller UC, Pommereningroser A, Stehr G (1991) Classification of 8 New Species of Ammonia-Oxidizing Bacteria - *Nitrosomonas-Communis* Sp-Nov, *Nitrosomonas-Ureae* Sp-Nov, *Nitrosomonas-Aestuarii* Sp-Nov, *Nitrosomonas-Marina* Sp-Nov, *Nitrosomonas-Nitrosa* Sp-Nov, *Nitrosomonas-*

Eutropha Sp-Nov, Nitrosomonas-Oligotropha Sp-Nov and Nitrosomonas-Halophila Sp-Nov. *Journal of General Microbiology* 137:1689-1699

Koroleff F (1969) Direct determination of ammonia in natural water as indophenol blue. *Int Cons Explor Sea* 9:1-6

Kristensen E (1985) Oxygen and Inorganic Nitrogen Exchange in a Nereis-Virens (Polychaeta) Bioturbated Sediment-Water System. *J Coastal Res* 1:109-116

Kuenen JG (2008) Anammox bacteria: from discovery to application. *Nature Reviews Microbiology* 6:320-326

Kuypers MMM, Sliekers AO, Lavik G, Schmid M, Jorgensen BB, Kuenen JG, Damste JSS, Strous M, Jetten MSM (2003) Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature* 422:608-611

L

Lacis A, Hansen J, Lee P, Mitchell T, Lebedeff S (1981) Greenhouse-Effect of Trace Gases, 1970-1980. *Geophysical Research Letters* 8:1035-1038

Laima MJC (1993) Recovery of (Nh)-N-15-H-4(+) in Labeling Experiments on Coastal Marine-Sediments. *Marine Chemistry* 44:31-42

Lane RR, Day JW, Marx BD, Reyes E, Hyfield E, Day JN (2007) The effects of riverine discharge on temperature, salinity, suspended sediment and chlorophyll a in a Mississippi delta estuary measured using a flow-through system. *Estuar Coast Shelf S* 74:145-154

Largier JL, Hollibaugh JT, Smith SV (1997) Seasonally hypersaline estuaries in Mediterranean-climate regions. *Estuar Coast Shelf S* 45:789-797

Laverman AM, Canavan RW, Slomp CP, Van Cappellen P (2007) Potential nitrate removal in a coastal freshwater sediment (Haringvliet Lake, The Netherlands) and response to salinization. *Water Research* 41:3061-3068

- Leininger S, Urich T, Schlöter M, Schwark L, Qi J, Nicol GW (2006) Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442:806-809
- Levin S (2001) *Fragile Dominion: Complexity and the Commons*. *Agriculture and Human Values* 18:239-240
- Levin SA, Lubchenco J (2008) Resilience, robustness, and marine ecosystem-based management. *Bioscience* 58:27-32
- Lohse L, Malschaert JFP, Slomp CP, Helder W, Vanraaphorst W (1993) Nitrogen Cycling in North-Sea Sediments - Interaction of Denitrification and Nitrification in Offshore and Coastal Areas. *Marine Ecology-Progress Series* 101:283-296
- Loreau M, Naeem S, Inchausti P, Bengtsson J, Grime JP, Hector A, Hooper DU, Huston MA, Raffaelli D, Schmid B, Tilman D, Wardle DA (2001) Ecology - Biodiversity and ecosystem functioning: Current knowledge and future challenges. *Science* 294:804-808
- Luck GW, Daily GC, Ehrlich PR (2003) Population diversity and ecosystem services. *Trends Ecol Evol* 18:331-336

M

- Magalhaes CM, Joye SB, Moreira RM, Wiebe WJ, Bordalo AA (2005) Effect of salinity and inorganic nitrogen concentrations on nitrification and denitrification rates in intertidal sediments and rocky biofilms of the Douro River estuary, Portugal. *Water Research* 39:1783-1794
- Meyer RL, Risgaard-Petersen N, Allen DE (2005) Correlation between anammox activity and microscale distribution of nitrite in a subtropical mangrove sediment. *Appl Environ Microb* 71:6142-6149
- Michener CD, Sokal RR (1957) A quantitative approach to a problem in classification. *Evolution* 11:130-162

- Michotey V, Guasco S, Boeuf D, Morezzi N, Durieu B, Charpy L, Bonin P (2012) Spatio-temporal diversity of free-living and particle-attached prokaryotes in the tropical lagoon of Ahe atoll (Tuamotu Archipelago) and its surrounding oceanic waters *Marine Pollution Bulletin* 65:525-537
- Minjeaud L, Bonin PC, Michotey VD (2008) Nitrogen fluxes from marine sediments: quantification of the associated co-occurring bacterial processes. *Biogeochemistry* 90:141-157
- Minjeaud L, Michotey VD, Garcia N, Bonin PC (2009) Seasonal variation in di-nitrogen fluxes and associated processes (denitrification, anammox and nitrogen fixation) in sediment subject to shellfish farming influences. *Aquatic Sciences* 71:425-435
- Mosier AC, Francis CA (2008) Relative abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the San Francisco Bay estuary. *Environmental Microbiology* 10:3002-3016
- Mulder A, Vandegraaf AA, Robertson LA, Kuenen JG (1995) Anaerobic Ammonium Oxidation Discovered in a Denitrifying Fluidized-Bed Reactor. *Fems Microbiology Ecology* 16:177-183
- Mulholland PJ, Helton AM, Poole GC, Hall RO, Hamilton SK, Peterson BJ, Tank JL, Ashkenas LR, Cooper LW, Dahm CN, Dodds WK, Findlay SEG, Gregory SV, Grimm NB, Johnson SL, McDowell WH, Meyer JL, Valett HM, Webster JR, Arango CP, Beaulieu JJ, Bernot MJ, Burgin AJ, Crenshaw CL, Johnson LT, Niederlehner BR, O'Brien JM, Potter JD, Sheibley RW, Sobota DJ, Thomas SM (2008) Stream denitrification across biomes and its response to anthropogenic nitrate loading. *Nature* 452:202-U246

N

- Nedwell DB, Jickells TD, Trimmer M, Sanders R (1999) Nutrients in estuaries. *Adv Ecol Res* 29:43-92

- Newton RJ, Jones SE, Eiler A, McMahon KD, Bertilsson S (2011) A Guide to the Natural History of Freshwater Lake Bacteria. *Microbiol Mol Biol R* 75:14-49
- Newton WE (2007) Physiology, biogeochemistry, and molecular biology of nitrogen fixation. In: Bothe FaN (ed) *Biology of the nitrogen cycle*. Elsevier
- Nicol GW, Leininger S, Schleper C, Prosser JI (2008) The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environmental Microbiology* 10:2966-2978
- Nielsen K, Risgaard-Petersen N, Somo B, Rysgaard S, Bergo T (2001) Nitrogen and phosphorus retention estimated independently by flux measurements and dynamic modelling in the estuary, Randers Fjord, Denmark. *Marine Ecology-Progress Series* 219:25-40
- Nielsen LP (1992) Denitrification in Sediment Determined from Nitrogen Isotope Pairing. *Fems Microbiology Ecology* 86:357-362
- Nielsen LP, Glud RN (1996) Denitrification in a coastal sediment measured in situ by the nitrogen isotope pairing technique applied to a benthic flux chamber. *Marine Ecology-Progress Series* 137:181-186
- Nishio T, Koike I, Hattori A (1983) Estimates of Denitrification and Nitrification in Coastal and Estuarine Sediments. *Appl Environ Microb* 45:444-450
- Nixon SW (1995) Coastal marine eutrophication: a definition, social causes and future concerns. *OPHELIA* 41:199-219

O

- Ogilvie B, Nedwell DB, Harrison RM, Robinson A, Sage A (1997) High nitrate, muddy estuaries as nitrogen sinks: The nitrogen budget of the River Colne estuary (United Kingdom). *Marine Ecology-Progress Series* 150:217-228

P

- Paerl HW, Dennis RL, Whitall DR (2002) Atmospheric deposition of nitrogen: Implications for nutrient over-enrichment of coastal waters. *Estuaries* 25:677-693
- Paerl HW, Zehr JP (2000) Marine nitrogen fixation. In: Kirchman DL (ed) *Microbial Ecology of the Oceans*. Wiley-Liss
- Palumbi SR, Mcleod KL, Grunbaum D (2008) Ecosystems in action: Lessons from marine ecology about recovery, resistance, and reversibility. *Bioscience* 58:33-42
- Prosser JI (1989) Autotrophic nitrification bacteria. *Advances in Microbial Physiology* 30:125-181
- Purkhold U, Pommerening-Roser A, Juretschko S, Schmid MC, Koops H-P, Wagner M (2000) Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Applied Environmental Microbiology* 66:5368-5382.

Q

- Quan ZX, Rhee SK, Zuo JE, Yang Y, Bae JW, Park JR, Lee ST, Park YH (2008) Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor. *Environmental Microbiology* 10:3130-3139

R

- Raimbault P, Diaz F, Pouvesle W, Boudjellal B (1999) Simultaneous determination of particulate organic carbon, nitrogen and phosphorus collected on filters, using a semi-automatic wet-oxidation method. *Marine Ecology-Progress Series* 180:289-295

- Risgaard-Petersen N, Meyer RL, Revsbech NP (2005) Denitrification and anaerobic ammonium oxidation in sediments: effects of microphytobenthos and NO₃-. *Aquatic Microbial Ecology* 40:67-76
- Risgaard-Petersen N, Meyer RL, Schmid M, Jetten MSM, Enrich-Prast A, Rysgaard S, Revsbech NP (2004) Anaerobic ammonium oxidation in an estuarine sediment. *Aquatic Microbial Ecology* 36:293-304
- Rotthauwe JH, Witzel KP, Liesack W (1997) The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microb* 63:4704-4712
- Rysgaard S, Glud RN, Risgaard-Petersen N, Dalsgaard T (2004) Denitrification and anammox activity in Arctic marine sediments. *Limnol Oceanogr* 49:1493-1502
- Rysgaard S, Risgaard-Petersen N, Sloth NP (1996) Nitrification, denitrification, and nitrate ammonification in sediments of two coastal lagoons in Southern France. *Hydrobiologia* 329:133-141
- Rysgaard S, Thastum P, Dalsgaard T, Christensen PB, Sloth NP (1999) Effects of salinity on NH₄⁺ adsorption capacity, nitrification, and denitrification in Danish estuarine sediments. *Estuaries* 22:21-30

S

- Saitou N, Nei M (1987) The Neighbor-Joining Method - a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425
- Santoro AE, Francis CA, De Sieyes NR, Boehm AB (2008) Shifts in the relative abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across physicochemical gradients in a subterranean estuary. *Environmental Microbiology* 10:1068-1079
- Scala DJ, Kerkhof LJ (1998) Nitrous oxide reductase (nosZ) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three nosZ genes from marine sediments. *Fems Microbiology Letters* 162:61-68

- Scheffer M, Carpenter S, Foley JA, Folke C, Walker B (2001) Catastrophic shifts in ecosystems. *Nature* 413:591-596
- Scheffer M, Carpenter SR (2003) Catastrophic regime shifts in ecosystems: linking theory to observation. *Trends Ecol Evol* 18:648-656
- Schimel JP, Firestone MK, Killham KS (1984) Identification of Heterotrophic Nitrification in a Sierran Forest Soil. *Appl Environ Microb* 48:802-806
- Schmid MC, Hooper AB, Klotz MG, Woebken D, Lam P, Kuypers MMM, Pommerening-Roeser A, op den Camp HJM, Jetten MSM (2008) Environmental detection of octahaem cytochrome c hydroxylamine/hydrazine oxidoreductase genes of aerobic and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Environmental Microbiology* 10:3140-3149
- Schubert CJ, Durisch-Kaiser E, Wehrli B, Thamdrup B, Lam P, Kuypers MMM (2006) Anaerobic ammonium oxidation in a tropical freshwater system (Lake Tanganyika). *Environmental Microbiology* 8:1857-1863
- Seitzinger S (2008) Nitrogen cycle - Out of reach. *Nature* 452:162-163
- Seitzinger SP (1988) Denitrification in Fresh-Water and Coastal Marine Ecosystems - Ecological and Geochemical Significance. *Limnol Oceanogr* 33:702-724
- Seitzinger SP, Kroeze C, Bouwman AF, Caraco N, Dentener F, Styles RV (2002) Global patterns of dissolved inorganic and particulate nitrogen inputs to coastal systems: Recent conditions and future projections. *Estuaries* 25:640-655
- Seitzinger SP, Nixon SW, Pilson MEQ (1984) Denitrification and Nitrous-Oxide Production in a Coastal Marine Ecosystem. *Limnol Oceanogr* 29:73-83
- Sikora WB, Kjerfve B (1985) Factors Influencing the Salinity Regime of Lake Pontchartrain, Louisiana, a Shallow Coastal Lagoon - Analysis of a Long-Term Data Set. *Estuaries* 8:170-180
- Simon J (2002) Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. *Fems Microbiology Reviews* 26:285-309

- Slawyk G, Raimbault P (1995) Simple Procedure for Simultaneous Recovery of Dissolved Inorganic and Organic Nitrogen in N-15-Tracer Experiments and Improving the Isotopic Mass-Balance. *Marine Ecology-Progress Series* 124:289-299
- Smith VH, Joye SB, Howarth RW (2006) Eutrophication of freshwater and marine ecosystems. *Limnol Oceanogr* 51:351-355
- Sorokin D, Tourova T, Schmid MC, Wagner M, Koops HP, Kuenen JG, Jetten M (2001) Isolation and properties of obligately chemolithoautotrophic and extremely alkali-tolerant ammonia-oxidizing bacteria from Mongolian soda lakes. *Archives of Microbiology* 176:170-177
- Souchu P, Gasc A, Collos Y, Vaquer A, Tournier H, Bibent B, Deslous-Paoli J-M (1998a) Biogeochemical aspects of bottom anoxia in a Mediterranean lagoon (Thau, France). *Marine Ecology-Progress Series* 164:135-146
- Souchu P, Gasc A, Collos Y, Vaquer A, Tournier H, Bibent B, Deslous-Paoli JM (1998b) Biogeochemical aspects of bottom anoxia in a Mediterranean lagoon (Thau, France). *Marine Ecology-Progress Series* 164:135-146
- Spott O, Stange CF (2007) A new mathematical approach for calculating the contribution of anammox, denitrification and atmosphere to an N-2 mixture based on a N-15 tracer technique. *Rapid Commun Mass Sp* 21:2398-2406
- Stehr G, Bottcher B, Dittberner P, Rath G, Koops HP (1995) The ammonia-oxidizing nitrifying population of the River Elbe Estuary. . *FEMS Microbial Ecology* 17:177-186
- Sternberg SR (1983) Biomedical Image-Processing. *Computer* 16:22-34
- Strous M, Jetten MSM (2004) Anaerobic oxidation of methane and ammonium. *Annual Review of Microbiology* 58:99-117
- Strous M, Kuenen JG, Jetten MSM (1999) Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Appl Environ Microb* 65:3248-3250

Sumner DM, Belaine G (2005) Evaporation, Precipitation, and Associated Salinity Changes at a Humid, Subtropical Estuary *Estuaries* 28:844-855

T

Thamdrup B, Dalsgaard T (2000) The fate of ammonium in anoxic manganese oxide-rich marine sediment. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 64:4157-4164

Thamdrup B, Dalsgaard T (2002) Production of N₂ through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. *Appl Environ Microb* 68:1312-1318

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Clustal-W - Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680

Tourna M, Freitag TE, Nicol GW, Prosser JI (2008) Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environmental Microbiology* 10:1357-1364

Tournoud MG, Perrin JL, Gimbert F, Picot B (2005) Spatial evolution of nitrogen and phosphorus loads along a small Mediterranean river: implication of bed sediments. *Hydrol Process* 19:3581-3592

Treguer P, Le Corre P (1975) Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer. Université de Bretagne Occidentale

Trimmer M, Nicholls JC, Deflandre B (2003) Anaerobic ammonium oxidation measured in sediments along the Thames estuary, United Kingdom. *Appl Environ Microb* 69:6447-6454

Trimmer M, Nicholls JC, Morley N, Davies CA, Aldridge J (2005) Biphasic behavior of anammox regulated by nitrite and nitrate in an estuarine sediment. *Appl Environ Microb* 71:1923-1930

Trimmer M, risgaard-Petersen N, Nicholls JC, Engstrom P (2006) Direct measurement of anaerobic ammonium oxidation (anammox) and denitrification in intact sediment cores. *Marine Ecology-Progress Series* 326:37-47

V

Vahtera E, Conley DJ, Gustafsson BG, Kuosa H, Pitkanen H, Savchuk OP, Tamminen T, Viitasalo M, Voss M, Wasmund N, Wulff F (2007) Internal ecosystem feedbacks enhance nitrogen-fixing cyanobacteria blooms and complicate management in the Baltic Sea. *Ambio* 36:186-194

Valiela I, McClelland J, Hauxwell J, Behr PJ, Hersh D, Foreman K (1997) Macroalgal blooms in shallow estuaries: Controls and ecophysiological and ecosystem consequences. *Limnol Oceanogr* 42:1105-1118

Viaroli P, Lasserre P, Campostrini P (2007) Lagoons and coastal wetlands - Preface. *Hydrobiologia* 577:1-3

W

Walker B, Holling CS, Carpenter SR, Kinzig A (2004) Resilience, Adaptability and Transformability in Social-ecological Systems *Ecology and Society* 2:5

Ward BB, Kilpatrick KA, Renger EH, Eppley RW (1989) Biological Nitrogen Cycling in the Nitracline. *Limnol Oceanogr* 34:493-513

Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ (1998) Prokaryotes: The unseen majority. *P Natl Acad Sci USA* 95:6578-6583

Wong KC (1995) On the Relationship between Long-Term Salinity Variations and River Discharge in the Middle Reach of the Delaware Estuary. *J Geophys Res-Oceans* 100:20705-20713

Wrage N, Velthof GL, van Beusichem ML, Oenema O (2001) Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biology & Biochemistry* 33:1723-1732

Wuchter C, Abbas B, Coolen MJL, Herfort L, van Bleijswijk J, Timmers P, Strous M, Teira E, Herndl GJ, Middelburg JJ, Schouten S, Damste JSS (2006) Archaeal nitrification in the ocean. *P Natl Acad Sci USA* 103:12317-12322

Y

Ysebaert T, Herman PMJ, Meire P, Craeymeersch J, Verbeek H, Heip CHR (2003) Large-scale patterns in estuaries: estuarine macrobenthic communities in the Schelde Estuary, NW Europe. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 57:335-355

Z

Zaghmouri I, Michotey VD, Guasco S, Raimbault P, Garcia N, Bernard G, Bonin PC (2013) Trends in salinity and inorganic nitrogen compounds in the Berre lagoon (1994-2011) bacterial activities and nitrogen budgets. *Marine Pollution Bulletin* 12

Zehr JP, Kudela RM (2011) Nitrogen Cycle of the Open Ocean: From Genes to Ecosystems. *Annu Rev Mar Sci* 3:197-225

Zehr JP, Ward BB (2002) Nitrogen cycling in the ocean: New perspectives on processes and paradigms. *Appl Environ Microb* 68:1015-1024

Zillen L, Conley DJ, Andren T, Andren E, Bjorck S (2008) Past occurrences of hypoxia in the Baltic Sea and the role of climate variability, environmental change and human impact. *Earth-Sci Rev* 91:77-92

Annexes

Annexes

Annexe 1(Actes des Rencontres Lagun'R, p176-180):

Quantification des activités du cycle de l'azote dans les sédiments de la station nord (SA1) de l'étang Berre : impact de ces processus sur l'état d'eutrophisation de l'écosystème

Imen Zaghmouri ^{a*}, Patricia Bonin ^a, Valérie Michotey ^a

^a Laboratoire de Microbiologie, Géochimie et Ecologie Marines, Centre d'Océanologie de Marseille, CNRS UMR 6117, Université de la Méditerranée, 163, avenue de Luminy, case 901, 13288 Marseille cedex 9, France

Résumé

Cette étude est focalisée sur la contribution du sédiment dans le stockage et le largage des différentes formes azotées (notamment le nitrate et l'ammonium). Un suivi des activités potentielles du cycle de l'azote a révélé que 40% du nitrate réduit sont assimilés dans chaîne trophique, 1% réduit en NH_4^+ par le processus de RDNA alors que près de 59% du nitrate réduit dans le sédiment sont éliminés, par le processus de dénitrification, sous forme de gaz (N_2). La dénitrification issue du nitrate de la colonne d'eau ne représente que 42% de la dénitrification totale, les 58% restants sont expliqués par le couplage nitrification-dénitrification et sont donc issus de l'oxydation indirecte du NH_4^+ en N_2 .

La plus grande lagune méditerranéenne française, l'étang de Berre, subit de fortes pressions anthropiques et naturelles. Dans cet étang, doté d'une profondeur et d'une superficie importantes, où la salinité devrait varier relativement lentement, dans une gamme étroite de variations, nous constatons une situation radicalement opposée consécutive des variations erratiques de la salinité dues aux rejets d'eau douce en provenance : (1) des rivières (Arc, Touloubre, Cadière) : 1012 millions de m³ en 2008, 254 millions de m³ en 2009 et 238 millions de m³ en 2010, (2) des affluents pluviaux (100 millions de m³ en 2008, 125 millions de m³ en 2009 et 93 millions de m³ en 2010) et (3) de la Durance suite aux turbinages de la centrale hydroélectrique (EDF) de Saint Chamas (841 millions de m³ dans la saison 2007/2008, 997 millions de m³ en 2009 et 952 millions de m³ (fin Novembre) en 2010) (Fig. 1).

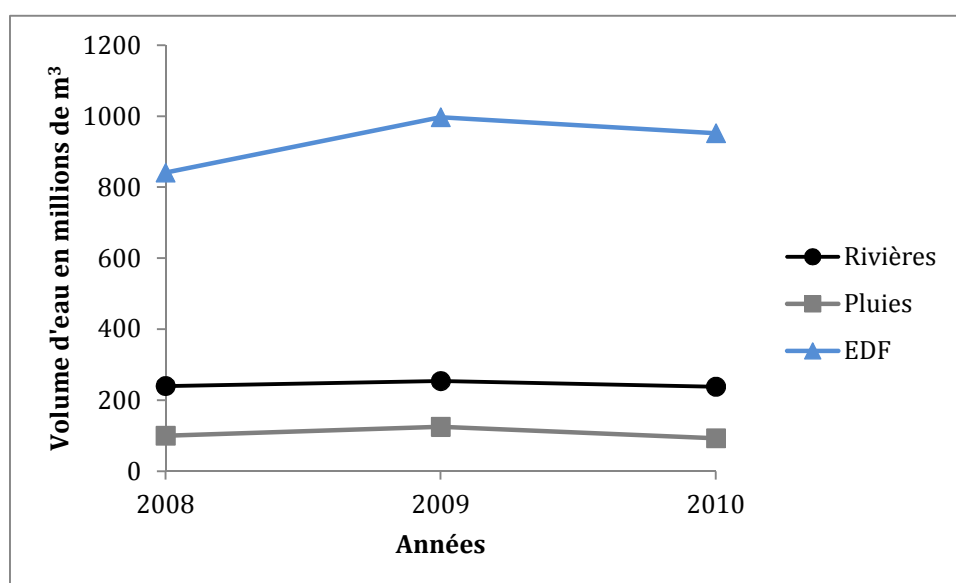


Fig. 1 Rejets d'eau douce dans l'étang de Berre en provenance des divers tributaires (2008-2010) (GIPREB 2010)

Le suivi réalisé depuis plusieurs années dans cet étang, confirme l'impact des flux d'eau douce dans l'enrichissement en azote, notamment par des apports en nitrate (Gouze et al. 2007). Dans le but d'améliorer l'état des connaissances et leur traduction en termes opérationnels ainsi que d'intensifier les mesures de lutte contre l'eutrophisation, un suivi des activités potentielles du cycle de l'azote, a été réalisé entre Avril 2010 et Avril 2011 dans les sédiments prélevés dans une station située au nord de l'étang (SA1), soumise à des apports d'eau douce.

En milieu eutrophe, le cycle de l'azote revêt un intérêt tout particulier puisqu'il va réguler la quantité d'azote disponible pour le phytoplancton, l'un des premiers maillons de la chaîne trophique. L'azote est assimilé par le phytoplancton sous forme d'ammonium ou de nitrate; l'ammonium est issu de la minéralisation de la matière organique dans les sédiments ou la colonne d'eau, alors que le nitrate provient

essentiellement de la nitrification et des apports allochtones d'origine terrigène (Bonin 2000).

Les échantillons sont incubés directement dans les carottiers, s'affranchissant ainsi de la remise en suspension des sédiments, après ajout des marqueurs $^{15}\text{NO}_3^-$ ou $^{15}\text{NH}_4^+$ (80 μM). Les cinétiques de production du $^{28,29,30}\text{N}_2$ ou de $^{14,15}\text{NH}_4^+$ ont permis de quantifier directement différents processus impliqués dans le cycle de l'azote (nitrification, dénitrification, Réduction Dissimilatrice des Nitrates en Ammonium, RDNA et anammox).

La réduction du nitrate (NaR) joue un rôle clé dans le cycle de l'azote. Elle permet l'utilisation du nitrate comme source d'azote nécessaire à la croissance (assimilation du nitrate), la génération d'une énergie métabolique en utilisant le nitrate comme accepteur final d'électron (respiration du nitrate), et la dissipation de l'excès du pouvoir réducteur pour l'équilibre redox (dissimilation du nitrate) (Moreno-Vivian et al. 1999).

La NaR dans la station SA1 présente une activité moyenne d'environ 7.5mmol/m².j, constante sur l'ensemble de l'année, à l'exception du mois de Novembre où on observe une activité supérieure (NaR atteignant 28mmol/m².j).

A l'échelle de l'année, environ 40% du NO_3^- consommé est assimilé par la chaîne trophique (Fig. 2).

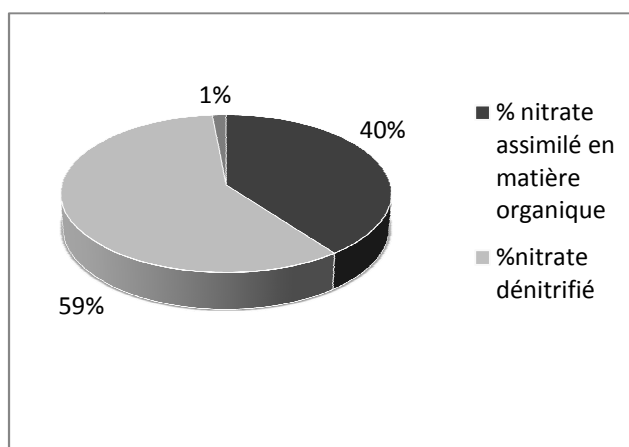


Fig. 2 Devenir du nitrate réduit dans le sédiment de la station nord de l'étang de Berre.

La dissimilation du nitrate est responsable de 60% du nitrate consommé (Fig.2). En fonction du produit terminal formé, on peut distinguer 2 processus dissimilatifs : (1) la dénitrification conduisant à la production de N_2 et qui constitue donc une perte nette d'azote pour l'écosystème (Bonin 2000 ; Herbert 1999), (2) la RDNA produisant du NH_4^+ . La dénitrification, avec une activité moyenne annuelle de 6.19mmol/m².j, est responsable de l'élimination de 59% du nitrate sous forme de N_2 , alors que seulement 1% du nitrate est réduit en ammonium par la RDNA (soit 0.09mmol/m².j). L'ammonium

ainsi formé est maintenu sous une forme facilement utilisable qui reste disponible dans la chaîne trophique (Bonin 2000, Soonmo et al. 2002).

Dans la station d'étude, l'activité moyenne annuelle de dénitrification *in situ* est d'environ 2.45mmol/m².j. Après enrichissement en nitrate (¹⁵NO₃⁻ à 80μM), la dénitrification potentielle atteint une moyenne annuelle de 6.19mmol/m².j. En raison de l'absence du processus d'anammox dans le milieu d'étude, tout le N₂ produit provient de la dénitrification. Dans les conditions environnementales naturelles, l'activité dénitrifiante est, de ce fait, limitée par les concentrations en NO₃⁻ montrant la potentialité d'épuration de l'étang de Berre.

Seulement 42% de la dénitrification totale du nitrate diffuse de la colonne d'eau (Fig. 3), alors que, les 58% restants proviennent du couplage entre la nitrification et la dénitrification et résulte donc en l'oxydation du NH₄⁺ en N₂ (moyenne annuelle de 8.38mmol/m².j) (Fig. 3). La coexistence de ces 2 processus (couplage nitrification-dénitrification) entraîne une perte nette de l'azote biodisponible de l'écosystème (Howarth et al. 1988, Soomno et al. 2001).

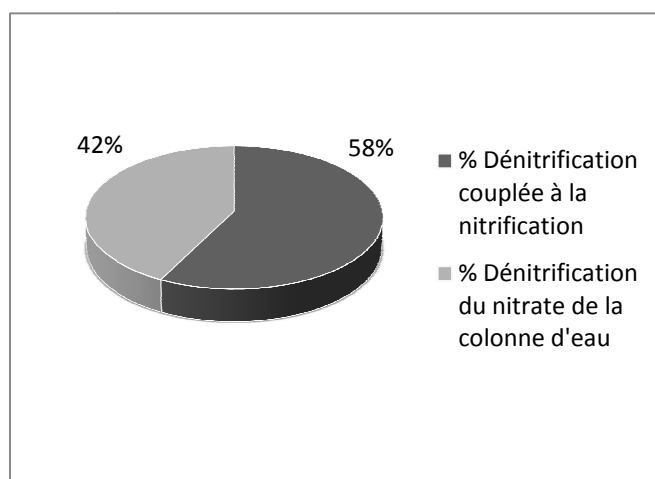


Fig. 3 Perte de l'azote organique sous forme de N₂ gaz par dénitrification et importance du couplage nitrification/dénitrification dans l'épuration de l'étang de Berre.

Le processus de dénitrification totale (du nitrate présent dans la colonne d'eau plus du nitrate issue de l'oxydation de l'ammonium par nitrification) représente une activité moyenne sur l'année de 14.59mmol/m².j. Cette activité où les valeurs observées se situent dans la gamme la plus élevée rapportée dans la littérature va ainsi constituer un réel frein naturel à l'eutrophisation en milieu marin côtier (Seitzinger 1988).

L'étang de Berre présente encore les caractéristiques d'un milieu fortement dégradé (GIPREB 2010). La lagune est, cependant, capable d'éliminer une partie de sa

charge eutrophisante, sous forme de gaz (N_2), favorisée par la dissimilation du nitrate réduit, principalement via le processus de dénitrification.

Références

- [1] **Bonin P.**, 2000. Le cycle de l'azote dans les écosystèmes marins côtiers. *Océanis* 26 : 687-710.
- [2] **Gestion intégrée, prospective et restauration de l'étang de Berre (GIPREB)**, 2010. **Etat écologique de l'étang de Berre 2009/2010.** <http://www.etangdeberre.org/suivi-ecologique.6>
- [3] **Gouze E., Raimbault P., Garcia N., Bernard G., Picon P.**, 2007. Nutrient and suspended matter discharge by tributaries into the Berre lagoon (France): the contribution of flood events to the matter budget. *TWB, Transit. Waters Bull* 2 : 17-40.
- [4] **Herbert R.A.**, 1999. Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 23 :563-590.
- [5] **Howarth, R. W., Marino R., Lane J.**, 1988. Nitrogen fixation in freshwater and marine ecosystems. I. Rates and importance. *Limnology and Oceanography* 33: 669–687.
- [6] **Moreno-Vivian C., Purificacion C., Martinez-Luque M., Blasco R., Castillo E.**, 1999. Prokaryotic Nitrate Reduction: Molecular Properties and Functional. Distinction among Bacterial Nitrate Reductases. *Journal Of Bacteriology* 181: 6573-6584.
- [7] **Seitzinger S.P.**, 1988. Denitrification in freshwater and coastal marine ecosystems: ecological and geochemical significance. *Limnology and Oceanography* 33: 702-724.
- [8] **Soomn A., Joye S.B.**, 2001. Enhancement of coupled nitrification-denitrification by benthic photosynthesis in shallow estuarine sediments. *Limnology and Oceanography* 46: 62–74.
- [9] **Soonmo A., Gardner W.S.**, 2002. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) as a nitrogen link, versus denitrification as a sink in a shallow estuary (Laguna Madre/Baffin Bay, Texas). *Marine Ecology Progress Series* 237: 41–50.

Annexe 2

ARTICLE IN PRESS

Marine Pollution Bulletin xxx (2012) xxx–xxx



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Marine Pollution Bulletin

journal homepage: www.elsevier.com/locate/marpolbul

Trends in salinity and inorganic nitrogen compounds in the Berre lagoon (1994–2011) bacterial activities and nitrogen budgets

Imen Zaghmouri^a, Valerie D. Michotey^a, Sophie Guasco^a, Patrick Raimbault^a, Nicole Garcia^a, Guillaume Bernard^b, Patricia C. Bonin^{a,*}^a Aix-Marseille University, Sud Toulon-Var University, CNRS/INSU, IRD, MIO, UM 110, 13288, Marseille, Cedex 09, France^b GIPREB Syndicat Mixte, Cours Mirabeau 13130 Berre-l'Étang, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Sediment
Nitrification
Denitrification
Anammox
Coupled nitrification/denitrification
Berre lagoon

ABSTRACT

The Berre lagoon receives freshwater from two natural rivers but the implementation of the hydroelectric power plant led to strong changes in the ecosystem structure and functioning. Sediments are important sites for nitrogen cycling because the O₂ sharp gradient allows oxic nitrification as well as anoxic denitrification and anammox to operate in close proximity. Seasonal and short-term variations in the coastal nitrogen processes were quantified at two stations: SA1 located in the northern part of the lagoon directly under the inflows of freshwater and SA3 in the southern part of the lagoon influenced mainly by the marine water inflows. Results revealed that most of the nitrate formed by nitrification was denitrified. Total denitrification was the main N₂ removal process. The high primary production based on N–NH₄⁺ might be explained by mineralization rates, while the primary production based on N–NO₃⁻ was not fully explained by nitrification.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Coastal lagoons are productive ecosystems, but they are often under strong natural and anthropogenic pressures. They receive freshwater inputs, rich in organic and mineral nutrients particularly nitrogen (N) and phosphorus (P) drained from heavily exploited catchment basins and by surrounding urban and industrial activities (Aliaume et al., 2007; Bernard et al., 2007; Bowen and Valiela, 2001; Valiela et al., 1997). In these water bodies, nutrient inputs often cause undesirable water quality changes (Smith et al., 2006), which in turn, stimulate eutrophication processes (Cadée et al., 2001; Cloern, 2001; Crossland et al., 2005). The combining effect of a high N and P exchange between the sediment and the water column and a low water turnover results in instability leading to the development of fast growing phytoplankton (Rysgaard et al., 1996). In coastal waters, eutrophication induces major ecological problems such as oxygen depletion or hypoxia (especially at the bottom of the water column) (Aliaume et al., 2007; Gouze et al., 2008; Minjeaud et al., 2008; Rysgaard et al., 1996), massive phytoplankton blooms, shifts in relative abundance of organisms and a loss in biodiversity (Jickells, 1998; Lane et al., 2005).

Inorganic nitrogen compounds can be introduced to coastal waters as nitrate (NO₃⁻), nitrite (NO₂⁻) and ammonium (NH₄⁺) via

tributaries, atmospheric deposition, groundwater inputs or through biological N-fixation (Brock, 2001; Gardner et al., 2006; Paerl et al., 2002; Seitzinger et al., 2002). Processes that affect the availability of inorganic nitrogen are important regulators of the ecosystem functioning and of the global N-biochemistry (Codispoti and Christensen, 1985; Schlesinger, 1997; Thamdrup and Dalsgaard, 2002). Therefore, an improved understanding of the nitrogen transformations and of its fate in the water column and in the sediments is needed to assess the water quality and health of aquatic ecosystems (Burgin and Hamilton, 2007; Galloway et al., 2008; Gardner and McCarthy, 2009; Horner-Devine and Martiny, 2008; Mulholland, 2008; Seitzinger, 2008).

The brackish Berre lagoon (SE France) has been under strong anthropogenic impacts through freshwater and nutrient inputs from its main natural tributaries (the Arc and Touloubre rivers) and moreover from the hydroelectric power plant implanted in 1966 at St. Chamas in the North (Bernard et al., 2007; Mars, 1966). Since then, freshwater inputs through the power plant have reached up to $6.630 \times 10^9 \text{ m}^3 \text{ y}^{-1}$ (almost seven times the lagoon's total volume). These loadings resulted in the decline of surface water salinity from 24–36 to 1–22 (Kim, 1985) and in the development of strong salinity stratification around 5 m of the water column (Bernard et al., 2007; Minas et al., 1976; Stora et al., 1995) preventing gas exchanges with the bottom layer (Nerini et al., 2001; Stora and Arnoux, 1988). Uncontrolled anthropogenic activities in the surrounding areas for several decades led to a very strong eutrophication of the lagoon with chlorophyll-*a*

* Corresponding author. Tel.: +33 491829336; fax: +33 491829641.

E-mail address: patricia.bonin@univ-amu.fr (P.C. Bonin).

ARTICLE IN PRESS

2

I. Zaghmouri et al. / Marine Pollution Bulletin xxx (2012) xxx–xxx

concentration ranging from 2 to 100 $\mu\text{g Chla L}^{-1}$ (Delpy et al., 2012). Highly colored surface water and hypoxia in the bottom layer were frequently observed (Becker, 1986; Bernard et al., 2007; Gouze et al., 2007; Minas, 1973) and led to strong changes in the structure and the functioning of this ecosystem with the extinction of various marine biological indicators, such as seagrasses and benthic macrofauna (Bernard et al., 2007; Gouze et al., 2007; Minas, 1974; Nerini et al., 2001; Stora et al., 1995).

In 1994, Barnier's management plan was firstly adopted to limit the freshwater loadings from the power plant into the lagoon. In 2005–2006, new managing strategies restricted the plant's loads to 1.3 times the lagoon's volume. Even though 2005–2006 were special years because of drought and freshwater inputs were, thus, lower than what they expected to be, Gouze et al., 2007 found that the power plant remains the main tributary of the lagoon doubling at least the annual natural discharge of nutrients, especially inorganic nitrogen and silt (60,000 tons of per year).

Despite these restrictions and the decrease in nutrient inputs over the past few years, there is still no sign of recolonization by the biological indicators (Gouze et al., 2008).

The role of the nutrients exchange between the sediments and the water column on eutrophication in this area is still unknown. The high dissolved inorganic nitrogen loads and the active ammonium and nitrate regeneration rates within the water column (Gouze et al., 2008), were nevertheless often unable to sustain primary production. As a matter of fact, sediments could play a major role in controlling the cycling and availability of nitrogen in coastal zones (Bonin et al., 1998; Boynton and Kemp, 1985; Giblin et al., 1997, 2010; Hopkinson et al., 1999; Nixon, 1981) because the sharp gradient of oxygen within the sediments allows oxic nitrification, anoxic denitrification and anammox to operate in close proximity (Jäntti et al., 2011; Jenkins and Kemp, 1984; Jensen et al., 1993, 1994).

In this study, the evolution of nitrate levels since 1994 in the Berre lagoon as well as the qualification and quantification of the annual and seasonal nitrogen processes in its sediment were investigated. This would expand our understanding on the role of the bottom water and sediment activities in controlling the eutrophication state of the lagoon.

2. Materials and methods

2.1. Study area

The Berre lagoon is located in SE France (43°30'N and 5°10'E) and is one of the largest Mediterranean coastal lagoons (155 km²) (Fig. 1) with a mean depth of 6 m and a maximum depth of 9.5 m for a total water volume of 980 million m³. It is connected to the sea through the Caronte Channel, in the south west corner, and receives freshwater and nutrients from its natural tributaries: the Arc and the Touloubre Rivers located in the north of the lagoon. In 1966, the hydroelectric power plant located at Saint-Chamas (northern part of the lagoon), collecting waters from the derivation canal of the Durance River started pouring large and uncontrolled volumes of freshwater and silt into the lagoon. (Bernard et al., 2007; Fèbre, 1968; Mars, 1949; Nerini et al., 2001; Schachter, 1954). Inputs are largely dependent upon electricity demands, and thus show display seasonal and inter-annual variability (Bernard et al., 2007; Gouze et al., 2007; Nerini et al., 2001).

The two sampling stations were located in two contrasted area (i.e. different salinity patterns) of the lagoon. The first one, SA1, (43°29.735N, 5°2.953E, bottom depth ~6 m) is located in the northern part of the lagoon directly under the influence of the hydroelectric power plant and the Arc and the Touloubre Rivers mouths, and is characterized by muddy sediment. The second

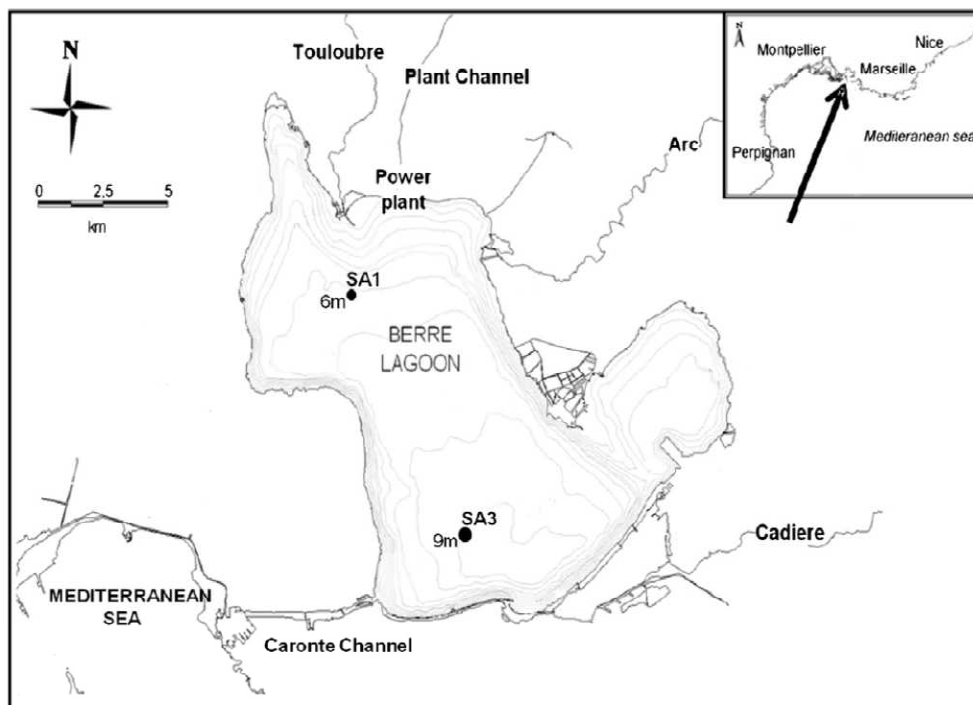


Fig. 1. Location of the sampling stations SA1 (43°29.735N, 5°2.953E, 6 m deep) and SA3 (43°25.300N, 5°6.219E, 9 m deep) in the Berre lagoon (SE France).

Please cite this article in press as: Zaghmouri, I., et al. Trends in salinity and inorganic nitrogen compounds in the Berre lagoon (1994–2011) bacterial activities and nitrogen budgets. Mar. Pollut. Bull. (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.11.046>

ARTICLE IN PRESS

I. Zaghmouri et al. / Marine Pollution Bulletin xxx (2012) xxx–xxx

3

one, SA3 (43°25.300N, 5°6.219E, bottom depth ~9 m) is located in the southern part of the lagoon in front of the Caronte channel with sandy mud sediment typified of the area.

2.2. Sample collection

Since 1994, the GIPREB (Gestion intégrée, prospective et restauration de l'étang de Berre) is following, on a monthly basis, the quality of the Berre ecosystem by measuring among other parameters nitrate and ammonium concentrations. Vertical profiles are done using a CTD YSI and Hydrolab multi-probe. Probes are provided with depth, temperature, salinity, dissolved oxygen (concentration and saturation), pH, and turbidity sensors, calibrated at the beginning of each sampling mission. Their internal memory can record data for each station at each depth. Measures accuracy is ± 0.012 m for depth, $\pm 0.15\%$ for temperature, $\pm 1\%$ salinity, $\pm 2\%$ for oxygen saturation. Probes are used at the same time during the entire follow-up period. Nitrate and ammonium were determined by a colorimetric method (Tréguer and Lecorre, 1975; Koroleff, 1970). In our case, we were interested in data of the bottom water layer.

During this study we also collected bottom water samples with a Niskin bottle, as well as sediments using box-cores (sediment depth of 8 cm) in April, July, September, November 2010 and February and April 2011. The cores were subsequently subsampled with acrylic tubes (length 12 cm, 3 cm inner diameter) without destroying the vertical structure of the sediment, filling the bottom half, of each tube, with sediment and the top half with bottom water. A total of 26 sub-cores were prepared from each site. During transportation, the 26 sub-cores were immersed at *in situ* temperature in bottom water and aerated to maintain oxygen gradients in the sediment, until the ^{15}N experiments were conducted.

2.3. Nutrient analysis

Five milliliters of synthetic seawater, nitrate/nitrite free, were added to 5 mL of sediment, homogenized and centrifuged for 10 min at 1000 g. Biological active ammonium was extracted from sediment using KCl extraction method (Laima, 1993). In the interstitial water, nitrate and nitrite concentrations were measured using a Technicon-Auto-Analyser according to Tréguer and Lecorre (1975). Ammonium concentrations in water and sediment were determined using the fluorometric method (Kérouel and Aminot, 1997). The loss-on-ignition (LOI%; combustion at 550 °C for 12 h), reflecting sediment organic content, was measured from the top 1 cm of the sediment.

In this study, $[\text{NO}_3^-]_{\text{H}_2\text{O}}$ and $[\text{NH}_4^+]_{\text{H}_2\text{O}}$ will refer to the bottom nitrate and ammonium measured by the GIPREB, $[\text{NO}_3^-]_{\text{Bottom water}}$ and $[\text{NH}_4^+]_{\text{Bottom water}}$ the nitrate and ammonium measured in the bottom water during this study and $[\text{NO}_3^-]_{\text{Sediment}}$ and $[\text{NH}_4^+]_{\text{Sediment}}$ the nitrate and ammonium measured in the sediment (particularly in the interstitial water) during this experiment.

2.4. Microbial activities

2.4.1. Experimental design

Back in the laboratory, sediment cores were immersed in an aquarium with 20 l containing bottom water kept at *in situ* temperature (± 1 °C) for 24 h to maintain the redox balance in the sub-cores.

The rates of the different processes, within the core, associated with the nitrogen cycle (ammonium production rates via mineralization, nitrification, nitrate reduction, Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium (DNRA), denitrification and anammox), were estimated using isotopic labeling ($^{15}\text{NO}_3^-$ or $^{15}\text{NH}_4^+$). The water column in each core was mixed using small magnetic stirrers

driven by an external magnet (30 r.p.m.). At initial time incubation, the water was saturated with oxygen and has never reached below 70% of the air saturation by the end of the incubation. For each point of the time series (0, 2, 4 and 6 h): 2 mL HgCl_2 (50% w/w) were added in duplicates of sub-cores, and sub-cores were vigorously shaken.

For denitrification and anammox measurements, gas and slurry (mixture of the sediment + overlying water) were gently transferred in duplicates with a syringe from the core to 3 mL glass vials (Venoject, Thermo®) and 15 mL were stored for further isotopic analysis of dissolved inorganic nitrogen (-20 °C). Rates of substrate consumption or product accumulation were then plotted against time and fitted to a linear model using the least squares method. Rates were calculated from the initial linear slope of the curve and rate uncertainties were extrapolated from the results of the linear regressions.

2.4.2. Denitrification and anammox rates

These activities were estimated from the same incubated sets of cores. $^{15}\text{NO}_3^-$ was added (99.6% atom%, Isotec Matheson) to the overlying water in three sets of cores with final concentrations of 80, 125 and 250 μM . For each point of time series, the headspace of the Venoject was injected into a mass spectrometer (Quadrupole mass spectrometer Anagaz 100, MKS, England) and concentrations of $^{29}\text{N}_2$ and $^{30}\text{N}_2$, in addition to $^{28}\text{N}_2$, Ar and O_2 , were measured. As anammox calculated following Minjeaud et al., 2008 using the three different $^{15}\text{NO}_3^-$ labeling never exceeded a few percent of the total N_2 production rates, denitrification rates can be calculated according to Nielsen (1992). This method differentiates between denitrification based in NO_3^- in the overlying water (D_w , IPT) and that produced by nitrification (D_n , IPT).

2.4.3. DNRA rates

The dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) based on nitrate in the bottom water was measured in the set of cores containing 80 μM of $^{15}\text{NO}_3^-$. The progressive increase in isotopic enrichment of ammonium was monitored over time as the substrate (nitrate) was used. Immediately after the end of the incubation (0, 2, 4, and 6 h), the overlying water and the sediment in the core were homogenized and 3 mL of the mixture was transferred into a 50 mL screwed flask, 1 g of magnesium oxide (MgO) was added. Ammonium was extracted in diffusion packets (~90% NH_4^+ recovery) of acidified (25 μL , 0.5 N H_2SO_4) fiberglass filter (Whatman, GF/C). After addition of the diffusion packet, flasks were immediately closed and incubated at room temperature at 60 °C for one week. Thereafter, the diffusion packets were removed from the bottles and dried out on a desiccator. After one day of drying, the packets were disassembled and the fiberglass filters were packed into silver foil cups (Elemental Microanalyses). The ^{15}N content was analyzed by mass spectrometry (Integra CN mass spectrometer, SERCON) (Bonin, 1996). The rates of dissimilatory ammonium production were calculated as previously described by Bonin et al., 1998.

2.4.4. Nitrate reduction rates

The total nitrate reduction rates were calculated by combining D_n , D_w , anammox and the DNRA rate (Dong et al., 2009; Jäntti et al., 2011).

2.4.5. Nitrification rates

N_w (nitrification providing nitrate to the water column) was determined in core set amended with $^{15}\text{NH}_4^+$ (10 μM , less than 10% of the *in situ* ammonium concentration). The progressive increase in isotopic enrichment of nitrate was monitored over time as the substrate (ammonium) was used. After two successive extractions of $^{14,15}\text{NH}_4^+$ by microdiffusion, the remaining $^{14,15}\text{NO}_3^-$

Please cite this article in press as: Zaghmouri, I., et al. Trends in salinity and inorganic nitrogen compounds in the Berre lagoon (1994–2011) bacterial activities and nitrogen budgets. Mar. Pollut. Bull. (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.11.046>

ARTICLE IN PRESS

4

I. Zaghmouri et al. / Marine Pollution Bulletin xxx (2012) xxx–xxx

within the flask was reduced chemically to ammonium with Devarda's alloy and subsequently microdiffused (Brooks et al., 1989). The rate of N_w was calculated from isotopic labeling of co-diffused nitrate and nitrite according to the equation developed

by Glibert et al., 1982. The total sediment nitrification rate includes then the nitrification providing NO_3^- to the water column (N_w) and the nitrification coupled to the denitrification (D_n , IPT) (Jäntti et al., 2011).

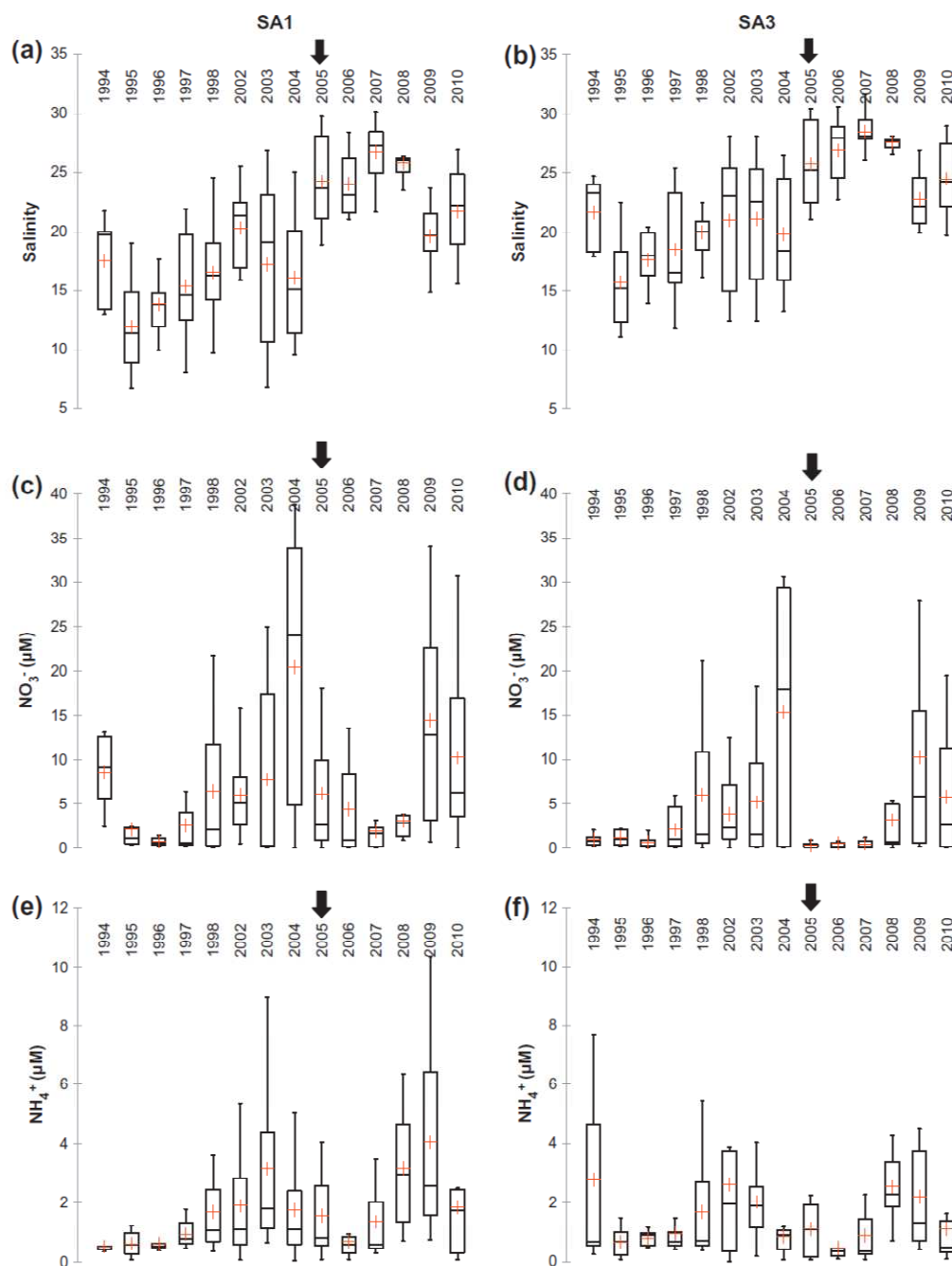


Fig. 2. Box plot comparing annual evolution of salinity values (a, b), nitrate (c, d) and ammonium (e, f) concentrations, in SA1 and SA3 respectively. These physical and chemical parameters were measured in the bottom layer of both stations. Arrows mark the year of effective restriction in freshwater and nutrient loadings. Box plot: the center vertical line marks the median, the edges of the box mark first and third quartiles and the vertical lines indicate the range of values that fall within 1.5 (midrange) of the hinges, the cross marks the mean value ($n = 192$ for each parameter of every station).

Please cite this article in press as: Zaghmouri, I., et al. Trends in salinity and inorganic nitrogen compounds in the Berre lagoon (1994–2011) bacterial activities and nitrogen budgets. Mar. Pollut. Bull. (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.11.046>

ARTICLE IN PRESS

I. Zaghmouri et al. / Marine Pollution Bulletin xxx (2012) xxx–xxx

5

2.4.6. Ammonium produced by mineralization

For the remaining set of cores, the ammonium production rates via mineralization were calculated from the isotopic dilution of $^{15}\text{NH}_4^+$ amongst the $^{14}\text{NH}_4^+$ produced by mineralization of organic matter. Ammonium was extracted from the solution by microdiffusion, as described above. The isotopic ratio of the extracted nitrogen was analyzed with a mass spectrometry (Integra CN mass spectrometer, SERCON).

2.5. Statistical analysis

Spatial and temporal variations in nitrogen processes were described using hierarchical analyses of variance (ANOVA).

Statistical relationships between the observations were investigated using Pearson's Correlation and were performed using XLSTAT[®] software package.

3. Results

3.1. Physico-chemical characteristics of the overlying water and sediments from 1994 to 2010

For the period of 1994–2010, the bottom salinity values ranged from 7 to 30 and from 11 to 31 at stations SA1 (Fig. 2a) and SA3 (Fig. 2b) respectively, and were significantly different between stations (Table 1). Both sites were impacted by the massive freshwater inflows through the power plant. A clear transition in the salinity pattern appeared. Before 2005–2006, the salinity showed important fluctuations (Fig. 2). After 2005–2006, a net trend towards increase in salinity was observed. Lower salinity never reached values lower than 15 at the both stations (Fig. 2).

Maximum values were around 30 and 31 for SA1 and SA3 respectively. During winter 2009 and 2010, lower salinity was linked to important flood events and increasing loadings of freshwater from the power plant due to a higher energy demand.

Nitrate concentrations measured at both stations are reported in Fig. 2c and d. Significantly higher values were observed at SA1 than at SA3 (Table 1). Between 1994 and 2010 nitrate concentrations did not show any clear inter-annual pattern. Before 2005–2006, annual mean ranged from $7.4 \pm 9.8 \mu\text{M}$ to $5.6 \pm 8.5 \mu\text{M}$ at SA1 (Fig. 2c) and SA3 (Fig. 2d), respectively occasionally reaching up to $39 \mu\text{M}$ (February 2004) and $31 \mu\text{M}$ (January 2004). Between 2005 and 2008, mean values were even lower with $4.2 \pm 5.7 \mu\text{M}$ and $1.8 \pm 3.7 \mu\text{M}$ reported at SA1 and SA3, respectively. In 2009–2010, nitrate concentrations increased (Fig. 2c and d) reaching $12 \pm 11.3 \mu\text{M}$ at SA1 and $7.4 \pm 9.4 \mu\text{M}$ at SA3.

NH_4^+ concentrations, at both stations (Fig. 2e and f) were between $0.59 \pm 0.18 \mu\text{M}$ and $4.04 \pm 3.26 \mu\text{M}$ at SA1 and $0.8 \pm 0.24 \mu\text{M}$ and $4 \pm 4.4 \mu\text{M}$ at SA3, and they did not show any specific pattern, even though higher values have been reported at SA1 since 2006.

The physical and chemical characteristics of the bottom water layer and the surface sediment did not follow any seasonal cycle at both stations. The lowest LOI% was recorded when temperatures were the highest (September). When temperature dropped, LOI% decreased. However, $(\text{NO}_3^-)_{\text{bottom water}}$, $(\text{NO}_3^-)_{\text{surface sediment}}$, $(\text{NH}_4^+)_{\text{bottom water}}$, $(\text{NH}_4^+)_{\text{surface sediment}}$ and $(\text{O}_2)_{\text{bottom water}}$ concentrations did not correlate with each other or with salinity (Table 2). Oxygen decrease was noticeable at relatively shallow depths (5 m), hypoxia has been measured in July 2010, particularly in SA3 (40% of oxygen saturation) (Fig. 3). In surface sediments, oxygen diffused only to 1.5 mm at both station, whatever the sampling periods (data not shown).

Table 1

ANOVA analysis comparing the stations (SA1 and SA3), time (season) and sediment layers for environmental parameter and bacterial N-processes. When a significant effect is found with 'Time', the month with maximal activity is indicated. When a significant effect is found with 'Station', the mean stimulation factor is indicated.

	Station	Month
<i>Environmental parameters</i>		
Salinity	($R^2 = 0.34$, $n = 192$)*** SA1 < SA3	($R^2 = 0.34$, $n = 192$)*** Autumn–Spring > winter
$[\text{NO}_3^-]_{\text{H}_2\text{O}}$	($R^2 = 0.43$, $n = 192$)** SA1 > SA3	($R^2 = 0.43$, $n = 192$)*** Winter > Summer
$[\text{NO}_3^-]_{\text{bottom water}}$	ns	ns
$[\text{NH}_4^+]_{\text{bottom water}}$	ns	ns
$[\text{O}_2]_{\text{bottom water}}$	ns	ns
$[\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-]_{\text{sediment}}$	ns	ns
$[\text{NH}_4^+]_{\text{sediment}}$	ns	ns
LOI (%)	ns	ns
<i>Bacterial N-process</i>		
NaR	ns	($R^2 = 0.35$, $n = 36$)* Autumn > Summer–Winter
Anammox	ns	Ns
D_n	ns	($R^2 = 0.54$, $n = 36$)*** Autumn > Summer–Winter
D_w	ns	($R^2 = 0.32$, $n = 36$)* Autumn > Winter–Spring
D_{tot}	ns	($R^2 = 0.66$, $n = 36$)*** Autumn > Summer–Winter
DNRA	ns	Ns
Nitrification	ns	Autumn > Summer–Winter ($R^2 = 0.45$, $n = 36$)** Summer > Winter
Mineralization	ns	($R^2 = 0.649$, $n = 24$)***

$[\text{NO}_3^-]_{\text{H}_2\text{O}}$ refers to the bottom nitrate measured by the GIPREB, $[\text{NO}_3^-]_{\text{bottom water}}$ and $[\text{NH}_4^+]_{\text{bottom water}}$, the nitrate and ammonium measured in the bottom water during this study and $[\text{NO}_3^-]_{\text{sediment}}$ and $[\text{NH}_4^+]_{\text{sediment}}$, the nitrate and ammonium measured in the sediment (particularly in the interstitial water) during this experiment.

NS: not significant.

* $p < 0.05$.

** $p < 0.01$.

*** $p < 0.001$.

Please cite this article in press as: Zaghmouri, I., et al. Trends in salinity and inorganic nitrogen compounds in the Berre lagoon (1994–2011) bacterial activities and nitrogen budgets. Mar. Pollut. Bull. (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.11.046>

ARTICLE IN PRESS

6

I. Zaghmouri et al. / Marine Pollution Bulletin xxx (2012) xxx–xxx

3.2. Bacterial activities

The Dissimilatory reduction of nitrate to nitrite (NaR) is an anaerobic reaction. It is a step prior to three anaerobic nitrate reduction processes: DNRA, denitrification and anammox (Bonin et al., 1998).

Mean NaR rates ($\text{NaR} = D_n + D_w + \text{DNRA} + \text{Anammox}$) were calculated at both stations ($12.29 \pm 5.77 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ at SA1 and $24.47 \pm 6.05 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ at SA3). Nitrate reduction rates followed a seasonal pattern (Table 1). Maximum rates were observed in November at both stations ($31.72 \pm 6.85 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ at SA1 and $42.96 \pm 26.88 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ at SA3) (Fig. 4).

Overall, denitrification seemed to be the main process responsible for the N_2 removal from the ecosystem. Anammox was not detected at any of the two stations. In late autumn, total denitrification showed the highest rates ($31.7 \pm 10.35 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ at SA1 and $42.95 \pm 9.15 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ at SA3 (Fig. 5) nearly two folds that observed in spring (Fig. 5, Table 1). D_n rates were about six times higher than D_w rates, at both stations and at all time (Fig. 5).

Total nitrification rates were measured here by combining nitrification coupled to nitrification (D_n , IPT) and nitrification producing NO_3^- to the water column (N_w , $^{15}\text{NH}_4^+$ oxidation) (Fig. 6). As for denitrification, nitrification showed low rates in spring that nearly increased by two folds during summer and tripled by late autumn and then decreased through winter (Fig. 6). NaR, denitrification and nitrification rates were higher at SA3 than at SA1, with the exception of April 2010 (Figs. 4–6).

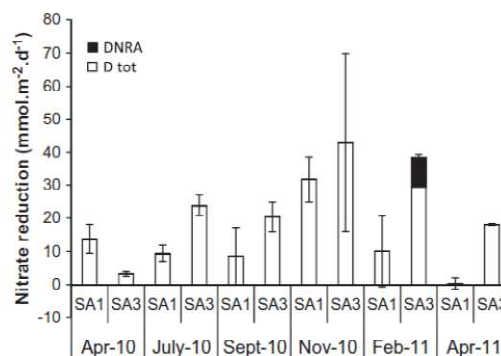


Fig. 4. Nitrate reduction pathway and SE comprising coupled nitrification–denitrification (D_n , in white), denitrification based on NO_3^- in the bottom water (D_w , in grey), dissimilatory nitrate reduction to ammonia (DNRA, in black) and anammox (not detected), $n = 12$.

The mineralization pathway, consisting of the apparent ammonium production (from mineralization of the organic matter within the sediments) and the total nitrification, showed the highest rate in summer at SA3 (reaching $97.32 \pm 5.17 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$), while at SA1, rates were rather similar throughout the year (Fig. 7), with the exception of April 2010.

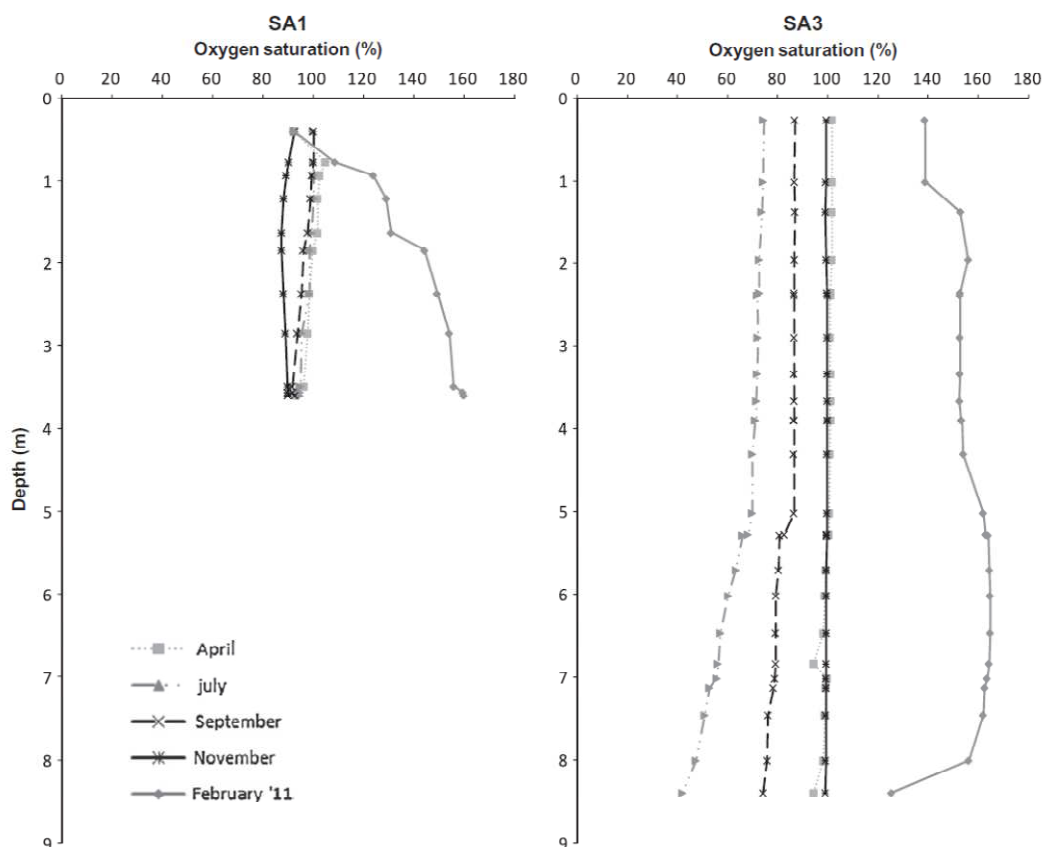


Fig. 3. Mean oxygen saturation (%) profiles at SA1 (a, to 4 m depth, $n = 11$) and SA3 (b, to 9 m depth, $n = 26$) from 1994 to 2011.

Please cite this article in press as: Zaghmouri, I., et al. Trends in salinity and inorganic nitrogen compounds in the Berre lagoon (1994–2011) bacterial activities and nitrogen budgets. Mar. Pollut. Bull. (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.11.046>

ARTICLE IN PRESS

I. Zaghmouri et al. / Marine Pollution Bulletin xxx (2012) xxx–xxx

7

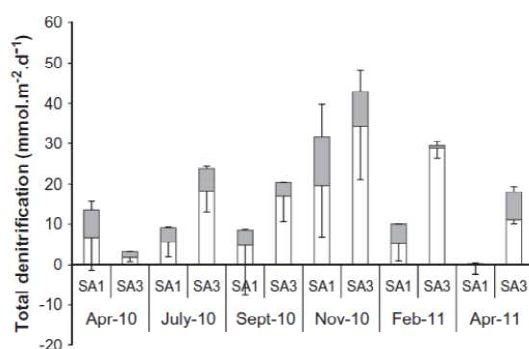


Fig. 5. Total denitrification rates and SE, comprising coupled nitrification–denitrification (D_n , in white) and denitrification based on NO_3^- in the bottom water (D_w , in grey), $n = 12$.

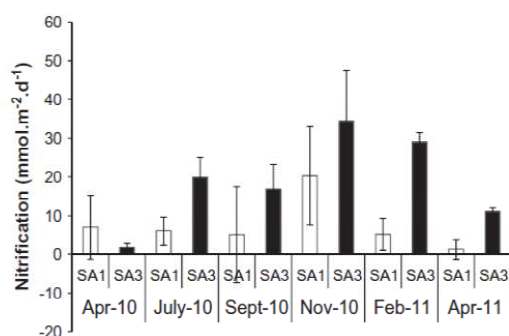


Fig. 6. Total nitrification rates and SE, comprising nitrification coupled to denitrification (D_n) and nitrification producing NO_3^- to the water column (N_w), $n = 12$.

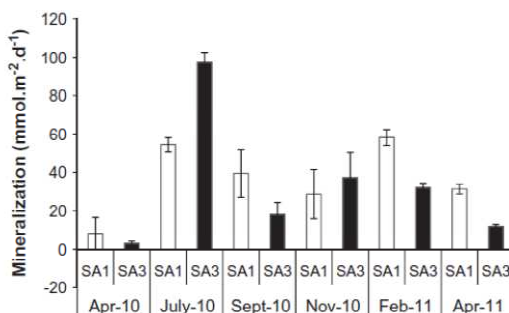


Fig. 7. Mineralization rates and SE, comprising the apparent ammonium production and the total nitrification, $n = 12$.

4. Discussion

Despite the new strategies of freshwater and nutrient inputs, our results showed that these restrictions did not clearly impact the nitrate concentrations in the water column. It also seemed that NH_4^+ availability was caused by a high organic content in the sediment and the water column. Salinity conditions have progressed with values no longer falling below 15, and reaching up to 30–31. Despite increasing salinities, stratification still persists particularly in the southern deeper areas of the lagoon (GIPREB, 2010). It prevents complete mixing of the water column, and leading in

connection with excessive nutrient loads from the drainage basin to hypoxia (Zillén et al., 2008). Hypoxia further fuels eutrophication because it enhances phosphorus (P) and nitrogen (N) release from sediment. Increased N and P availability stimulates primary production, which in turn causes higher decomposition and depleting O_2 (Vahtera et al., 2007). In 2005–2006, the primary production in the Berre lagoon was higher by one or two orders of magnitude than the adjacent seawater (Mediterranean) (Gouze et al., 2008). These authors suggested some hypothesis to explain this high primary production, including nitrogen removal processes within the sediment that could counteract eutrophication (Gouze et al., 2008).

N can be removed from the water column by anammox and denitrification processes (Capone, 2000), where nitrate and nitrite are reduced into dinitrogen (N_2) (Thamdrup and Dalsgaard, 2002; Van de Graaf et al., 1997; Zehr and Kudela, 2011). In our study, anammox was not detected probably because the Berre lagoon does not provide an optimal habitat for anammoxifiers. This was already reported by Minjeaud et al., 2009 in the coastal sediment of the nearby Gulf of Fos (SE France) where anammox occurred only occasionally while at time it accounted for up to 39% of the N_2 production. Denitrification rates in coastal sediments are usually higher than rates measured in continental shelf sediments (Hietanen and Kuparinen, 2007; Lohse et al., 1993). Denitrification activities observed in the Berre lagoon sediments are among the highest ones reported in the literature for estuaries, with up to $14.25 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ for the Tama estuary and $25.6 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ for the Tejo estuary (Nishio et al., 1983; Seitzinger, 1988). Whereas the remaining nitrate in the bottom water had only a minor effect on total denitrification rate, it was closely connected to the nitrate produced by nitrification in the sediment. In the Berre lagoon, D_{tot} (Total denitrification = $D_n + D_w$) originates largely from D_n (from 60% to 80%) (Table 1), highlighting the nitrification–denitrification coupling role in the removal of substantial amounts of ammonium from the ecosystem (Lohse et al., 1993). The highest denitrification rates occurred in late autumn when nitrate inputs were highest (Table 2) and NO_3^- uptake (primary production) limited by nitrate availability (Fig. 8b). In addition to hypoxia, salinity variations in the Berre lagoon are of a great concern and are thought to act on the eutrophication state of the lagoon. In our study, denitrification rates were not correlated to salinity values. This is in line with several previous studies that reported no effect between denitrification and salinity changes (Fear et al., 2005; Magalhaes et al., 2005; Nielsen et al., 2001), whereas other studies showed an inverse relationship between denitrification rates and salinity (Giblin et al., 2010; Laverman et al., 2007; Rysgaard et al., 1999).

A relationship could exist between high LOI% and high denitrification rates. The most obvious reason is that denitrifying bacteria are heterotrophic and depend upon organic carbon as their energy source (Jäntti and Hietanen, 2012). Also, when organic carbon availability was high, nitrification rates were high, which provided NO_3^- for denitrification (Figs. 5 and 6). Dong et al., 2000 reported also a significant positive correlation between high denitrification rates in sediments with elevated organic carbon content.

Nitrification rates measured in the Berre lagoon showed over that one year survey a seasonal pattern with highest activity occurring in late autumn, when $[\text{NH}_4^+]$ released from the sediments is the highest. The high availability of O_2 and NH_4^+ in the sediment and the bottom water increased nitrification (Table 2). Our results showed no effect of salinity on nitrification activity. In the literature, nitrification was nevertheless reported to be either inhibited (Bernhard et al., 2005, 2007; Campos et al., 2002; Rysgaard et al., 1999) or stimulated when salinity increased (Magalhaes et al., 2005).

The dissimilative rate of nitrate reduction into ammonium (DNRA), maintains however available nitrogen for primary producers. In the Berre lagoon sediments, except in February 2011, rates

ARTICLE IN PRESS

8

I. Zaghmouri et al. / Marine Pollution Bulletin xxx (2012) xxx–xxx

Table 2

Temperature, salinity in the bottom water and DIN concentrations in the bottom water and sediments, from April 2010 to April 2011, at SA1 and SA3.

Sampling time	April 2010		July 2010		September 2010		November 2010		February 2011		April 2011	
	SA1	SA3	SA1	SA3	SA1	SA3	SA1	SA3	SA1	SA3	SA1	SA3
Bottom water												
T (°C)	13.9	13.1	19.0	18.7	20.6	20.2	13.3	15.9	5.9	5.7	16.0	14.6
Salinity	21	33	20	30	22	23	27	33	22	33	24	33
[NO ₃ ⁻] μM	36.7	6.1	6.3	7.4	1.8	0.2	6.1	5.6	0.3	54.9	21.1	2.5
[NO ₂ ⁻] μM	0.9	1.4	20.5	20.5	0.1	0.03	0.5	0.7	0.2	0.2	0.6	1.9
[NH ₄ ⁺] μM	9.55	3.94	2.75	6.96	1.87	1.6	5.93	6.34	3.36	1.17	3.34	1.14
[O ₂] mg/l	8.13	10.7	6.54	2.82	7.01	5.28	8.82	9.16	17.64	10.4	8.2	11
Sediment												
[NO ₃ ⁻ + NO ₂ ⁻] μM	1.1	1.5	1.3	1.1	1	1.5	1.4	2.2	2.1	1.3	1.5	2.1
[NH ₄ ⁺] μM	285.0	388.4	345.5	286.2	297.2	438.7	304.8	518.3	107.2	61.3	234.0	215.6
LOI (%)	14.4	13.6	9.7	10.3	8.4	13.2	10.1	12.0	12.8	16.1	12.0	14.1

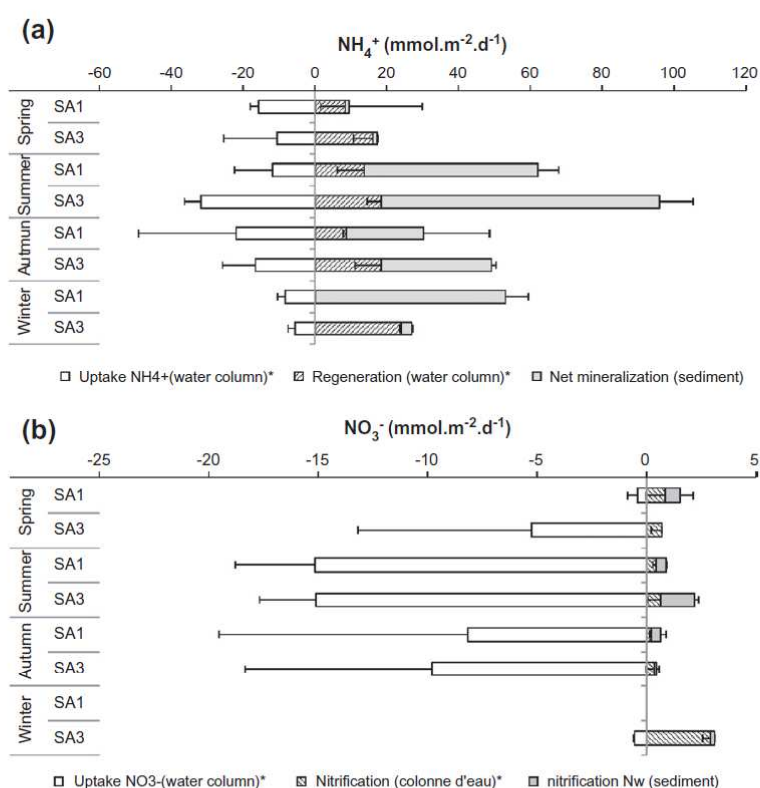


Fig. 8. (a) Ammonium N-NH₄⁺ budget and SE comprising pelagic uptake, water column regeneration and sediment net mineralization, (b) nitrate N-NO₃⁻ budget and SE comprising pelagic uptake, net nitrification pelagic and nitrification producing NO₃⁻ to the water column (N_w). (*pelagic uptake and water column regeneration data were collected from Gouze et al. (2008) in the same stations).

were low and their contribution to the NH₄⁺ flux seemed to be insignificant. Mineralization is a regeneration process that transforms organically bound nitrogen to NH₄⁺, a biologically available form for both bacteria and phytoplankton. This regenerated nitrogen has several potential fates: it may diffuse towards the overlying water, be assimilated by the trophic chain, or be nitrified and then denitrified, resulting in a net loss of nitrogen for the ecosystem.

Although nutrient inputs into the Berre lagoon have decreased over the past few years, in relation to freshwater discharge restrictions and sewage treatments (Gouze et al., 2008), the fate of nutrients and the causes of massive phytoplankton blooms are still not

fully understood. Eyre and Ferguson (2002) showed that the relative percentages of the different forms of nitrogen ex-fluxing from the sediment into the water column have important implications for the trophic status of coastal lagoons. Ammonium (Fig. 8a) and nitrate (Fig. 8b) budgets were established from our dataset and that provided by Gouze et al., 2008. Gouze et al., 2008) showed that the annual N-NH₄⁺ pelagic regeneration in the water column (~20,000 tons y⁻¹) and the annual N-NH₄⁺ inputs from atmospheric deposits (~39 tons y⁻¹), tributaries (~33 tons y⁻¹) and sea water (~11 tons y⁻¹) could generally support the pelagic uptake (~15,500 tons y⁻¹). During summer, N-NH₄⁺ pelagic regeneration and external inputs sustained only 60 to 77% of the

Please cite this article in press as: Zaghmouri, I., et al. Trends in salinity and inorganic nitrogen compounds in the Berre lagoon (1994–2011) bacterial activities and nitrogen budgets. Mar. Pollut. Bull. (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.11.046>

ARTICLE IN PRESS

I. Zaghmouri et al. / Marine Pollution Bulletin xxx (2012) xxx–xxx

9

ammonium uptake (Gouze et al., 2008). Based on our mineralization results (Fig. 7), the estimated net ammonium mineralization from sediment ($\sim 7000 \text{ tons y}^{-1}$) could sustain this uptake. Nitrate uptake is far more important than the regenerated nitrate from both the water column and the sediments. According to Gouze et al. (2008), nitrate produced by the pelagic net nitrification ($\sim 500 \text{ tons y}^{-1}$) was insufficient to explain the nitrate uptake ($\sim 4000 \text{ tons y}^{-1}$). The exogenous N-NO_3^- inputs reached $\sim 92 \text{ tons y}^{-1}$ from the atmospheric deposits, $\sim 506 \text{ tons y}^{-1}$ from the tributaries and $\sim 30 \text{ tons y}^{-1}$ from the seawater. Gouze et al. (2008) estimated that there is a deficit of $\sim 3000 \text{ tons of } \text{NndashNO}_3^-, N_w$ providing only $\sim 340 \text{ tons y}^{-1}$. The deficit in nitrate budget could be explained by an underestimation of the nitrification flux in the water column as nitrate produced by nitrification could instantaneously be taken up by phytoplankton in such dynamic ecosystem, despite the large amount of available ammonium which is the favorite phytoplankton form of nitrogen. Thus, nitrogen returned as NH_4^+ and nitrate may further stimulate productivity in the water column, resulting in the delivery of more organic matter to the sediments and leading to greater decomposition. In contrast, nitrogen returned as N_2 (denitrification) is lost from the system, which helps to reduce the effects of nutrient enrichment. Relating the denitrification flux to the remineralization flux allowed us to estimate the denitrification efficiency for this system. Denitrification efficiency is in fact the percentage of inorganic nitrogen (DIN) released from the sediment as dinitrogen gas (N_2) during the decomposition of organic matter: $(\text{N}_2\text{-N}/(\text{DIN} + \text{N}_2\text{-N}) \times 100)$ (Eyre and Ferguson, 2002). In our study, denitrification efficiency has reached 29.5% at SA1 and 59% at SA3, suggesting that denitrification is therefore an important N_2 removal pathway. $24,000 \text{ tons y}^{-1}$ of nitrogen is thus eliminated from the Berre lagoon as N-N_2 including $17,000 \text{ tons y}^{-1}$ being done through the coupled nitrification denitrification process. Thus, most of the removed nitrogen through denitrification comes from ammonium pool. It seems that NH_4^+ availability is caused by high levels of particulate organic nitrogen in the sediment brought by high silt inputs (Gouze et al., 2008) rather than ammonium inputs by the tributaries which represent only 83 tons of N-NH_4^+ .

5. Conclusion

The Berre lagoon is largely conditioned by the nature and the quantity of inputs (freshwater, nutrients, organic matter) from its tributaries (rivers and hydroelectric power plant). The contribution of sediment in the storage and the release of different nitrogen forms may partly explain the regeneration of nitrogen and thus, respond to the pelagic demand. To highlight the role of sediment as a source of nitrogen nutrients, seasonal patterns of ammonium assimilation rates, net nitrification, nitrate reduction (NaR), Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium (DNRA), denitrification and anammox were quantified in two sampling stations: SA1 situated north of the lagoon and subject to freshwater inflows and SA3 which was located south of the lagoon and under marine influence. Results revealed that 60–80% of the nitrate formed by nitrification was denitrified (D_n). Denitrification was the only process responsible of the dinitrogen production and elimination of nitrogen in excess in the Berre lagoon ecosystem. DNRA was a process of a low magnitude and less than 10% of the reduced nitrate was converted to NH_4^+ .

Berre lagoon is still a very productive ecosystem, with a high primary production. Regeneration processes within the sediment were active, and could, at least partially, sustain the pelagic demand. Several factors could also explain this high primary production such as an underestimation of atmospheric deposits, of the amount of

marine waters entering the lagoon from the Mediterranean Sea, an underestimation of regeneration and nitrification processes within the water column and the sediment, and/or benthos death and degradation. Ammonium regeneration rates in sediment were relatively high comparing to values reported for the water column at same sampling sites. The high primary production based on ammonium as N source may be explained by the ammonium regeneration rates and was responsible of eutrophication event. All these nitrogen sources could cause massive phytoplankton blooms and might explain the accumulation of N-NH_4^+ in the bottom.

The Berre lagoon seems to be a “sink” and a “source” for nutrients. Despite the decrease in nitrogen inputs and the stabilisation of the salinity between 15 and 25, the Berre lagoon still presents the characteristics of a highly eutrophic environment.

Acknowledgements

The authors are thankful to CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique), Université Aix Marseille II – Mediterranean, Grants from the INSU-EC2CO – Microbien 2010 program and ANR Izoflux. I. Zaghmouri is granted by fellowship of the Tunisian Ministry of Education, Scientific Research and Technology. I. Zaghmouri also thanks Delphine Botha for the English and for her helpful comments on the paper.

References

- Aliaume, C., Do Chi, T., Viaroli, P., Zaldivar, J.M., 2007. Coastal lagoons of Southern Europe: recent changes and future scenarios. *Trans. Water Mono.* 1, 1–12.
- Becker, B., 1986. Communautés phytoplanctoniques en milieu côtier à salinité variable (étang de Berre et golfe de Fos). University of Aix-Marseille, France, Doctoral thesis.
- Bernard, C., Boudouresque, C.F., Picon, P., 2007. Long term changes in *Zostera* meadows in the Berre lagoon (Provence, Mediterranean Sea). *Estuar Coast. Shelf Sci.* 73, 617–629.
- Bernhard, A.E., Donn, T., Giblin, A.E., Stahl, D.A., 2005. Loss of diversity of ammonia-oxidizing bacteria correlates with increasing salinity in an estuary system. *Environ. Microb.* 7, 1289–1297.
- Bernhard, A.E., Tucker, J., Giblin, A.E., Stahl, D.A., 2007. Functionally different communities of ammonia oxidizing bacteria along an estuarine salinity gradient. *Environ. Microb.* 9, 1439–1447.
- Bonin, P., 1996. Anaerobic nitrate reduction to ammonium in two strains isolated from coastal marine sediment: a dissimilatory pathway. *Fems Microb. Ecol.* 19, 1067–1077.
- Bonin, P., Omnes, P., Chalamet, A., 1998. Simultaneous occurrence of denitrification and nitrate ammonification in sediments of the French Mediterranean Coast. *Hydrobiologia* 389, 169–182.
- Bowen, J.L., Valiela, I., 2001. The ecological effects of urbanization of coastal watersheds: historical increases in nitrogen loads and eutrophication of Waquoit Bay estuaries. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 58, 1489–1500.
- Boynton, W.R., Kemp, W.M., 1985. Nutrient regeneration and oxygen consumption by sediments along an estuarine salinity gradient. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 23, 45–55.
- Brock, D.A., 2001. Nitrogen budget for low and high freshwater inflows, Nueces Estuary, Texas. *Estuaries* 24, 509–521.
- Brooks, P.D., Stark, J.M., Mcinteer, B.B., Preston, T., 1989. Diffusion method to prepare soil extracts for automated nitrogen-15 analysis. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 53, 1707–1711.
- Burgin, A.J., Hamilton, S.K., 2007. Have we overemphasized the role of denitrification in aquatic ecosystems? A review of nitrate removal pathways. *Ecol. Soc. Am. J.* 5, 89–96.
- Cadée, N., Dronkers, J., Heip, C.H.R., Martin, J.M., Nolan, C., 2001. European Land-Ocean Interaction Studies, Science Plan, Ecosystem Research Report 11. European Commission, Luxembourg.
- Campos, J.L., Mosquera-Corral, A., Mendez, R., Lema, J.M., 2002. Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in an activated sludge unit. *Water Res.* 36, 2555–2560.
- Capone, D.G., 2000. *The Marine Microbial Nitrogen Cycle*. Wiley-Liss Inc., New York, pp. 455–494.
- Cloern, J.E., 2001. Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 210, 223–253.
- Codispoti, L.A., Christensen, J.P., 1985. Nitrification, denitrification and nitrous oxide cycling in the eastern tropical South Pacific Ocean. *Mar. Chem.* 16, 277–300.
- Crossland, C.J., Kremer, H.H., Lindeboom, H.J., Marshall Crossland, J.I., Le Tissier, M.D.A., 2005. Coastal Fluxes in the Anthropocene. *The Land–Ocean Interactions*

ARTICLE IN PRESS

10

I. Zaghmouri et al. / Marine Pollution Bulletin xxx (2012) xxx–xxx

- in the Coastal Zone Project of the International Geosphere – Biosphere Programme. Global Change – The IGBP, pp. 20–232.
- Delpy, F., Pagano, M., Blanchot, J., Carliotti, F., Thibault-Botha, D., 2012. Man-induced hydrological changes, metazooplankton communities and invasive species in the Berre Lagoon (Mediterranean Sea, France). *Mar. Pollut. Bull.* 64, 1921–1932.
- Dong, L.F., Thornton, D.C.O., Nedwell, D.B., Underwood, G.J.C., 2000. Denitrification in sediments of the River Colne estuary. *England Mar. Ecol. Prog. Ser.* 203, 109–122.
- Dong, L.F., Smith, C.J., Papaspyrou, S., Stott, A., Osborn, A.M., David, B., Nedwell, D.B., 2009. Changes in benthic denitrification, nitrate ammonification, and anammox process rates and nitrate and nitrite reductase gene abundances along an estuarine nutrient gradient (the Colne estuary, United Kingdom). *Appl. Environ. Microb.* 75, 3171–3179.
- Eyre, B.D., Ferguson, A.J.P., 2002. Comparison of carbon production and decomposition, benthic nutrient fluxes and denitrification in seagrass, phytoplankton, benthic microalgae- and macroalgae-dominated warm-temperate Australian lagoons. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 229, 43–59.
- Fear, J.M., Thompson, S.P., Gallo, T.E., Paerl, H.W., 2005. Denitrification Rates Measured Along a Salinity Gradient in the Eutrophic Neuse River Estuary, North Carolina, USA. *Estuaries* 28, 608–619.
- Fèbvre, J., 1968. Etude bionomique des substrats meubles de l'étang de Berre. *Recl. Trav. Station Mar. d'Endoume* 44, 298–355.
- Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erisman, J.W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J.R., Martinelli, L.A., Seitzinger, S.P., Sutton, M.A., 2008. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Sci.* 320, 889–897.
- Gardner, W.S., McCarthy, A.M.J., 2009. Nitrogen dynamics at the sediment–water interface in shallow, sub-tropical Florida Bay: why denitrification efficiency may decrease with increased eutrophication. *Biogeochemistry* 95, 185–198.
- Gardner, W.S., McCarthy, M.J., An, S., Sobolev, D., Sell, K.S., Brock, D., 2006. Nitrogen fixation and dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) support nitrogen dynamics in Texas estuaries. *Limnol. Oceanogr.* 51, 558–568.
- Giblin, A.E., Hopkinson, C.S., Tucker, J., 1997. Benthic metabolism and nutrient cycling in Boston Harbor. *Mass. Est. Est. J.* 20, 346–364.
- Giblin, A.E., Weston, N.B., Banta, G.T., Tucker, J., Hopkinson, C.S., 2010. The effects of salinity on nitrogen losses from an oligohaline estuarine sediment. *Estuaries* 33, 1054–1068.
- Glibert, P., Lipschultz, F., McCarthy, J., Ma, A., 1982. Isotope dilution models of uptake and remineralization of ammonium by marine plankton. *Limnol. Oceanogr.* 27, 639–650.
- Gouze, E., Raimbault, P., Garcia, N., Bernard, G., Picon, P., 2007. Nutrient and suspended matter discharge by tributaries into the Berre Lagoon (France): the contribution of flood events to the matter budget. *Comptes Rendus Geosci.* 340, 233–244.
- Gouze, E., Raimbault, P., Garcia, N., Picon, P., 2008. Nutrient dynamics and primary production in the eutrophic Berre lagoon (Mediterranean, France). *Trans. Water Bull.* 2, 17–40.
- Hietanen, S., Kuparinen, J., 2007. Seasonal and short-term variation in denitrification and anammox at a coastal station on the Gulf of Finland, Baltic Sea. *Hydrobiologia* 596, 67–77.
- Hopkinson, C.S., Giblin, A.E., Tucker, J., Garritt, R.H., 1999. Benthic metabolism and nutrient cycling along an estuarine salinity gradient. *Estuaries* 22, 825–843.
- Horner-Devine, M.C., Martiny, A.C., 2008. News about nitrogen. *Science* 320, 757–758.
- Jäntti, H., Hietanen, S., 2012. The effects of Hypoxia on sediment nitrogen cycling in the Baltic Sea. *Ambio* 41, 161–169.
- Jäntti, H., Stange, F., Leskinen, E., Hietanen, S., 2011. Seasonal variation in nitrification and nitrate reduction pathways in coastal sediments in Gulf of Finland, Baltic Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 63, 171–181.
- Jenkins, M., Kemp, W., 1984. The coupling of nitrification and denitrification in two estuarine sediments. *Limnol. Oceanogr.* 29, 609–619.
- Jensen, K., Revsbech, N., Nielsen, N., 1993. Microscale distribution of nitrification activity in sediment determined with a shielded microsensor for nitrate. *Appl. Environ. Microb.* 59, 3287–3296.
- Jensen, K., Sloth, N., Risgaard-Petersen, N., Rysgaard, S., Revsbech, N., 1994. Estimation of nitrification and denitrification from micropores of oxygen and nitrate in model sediment systems. *Appl. Environ. Microb.* 60, 2094–2100.
- Jickells, T.D., 1998. Nutrient biogeochemistry of the Coastal Zone. *Science* 281, 217–222.
- Kérouel, R., Aminot, A., 1997. Fluorometric determination of ammonia in sea and estuarine waters by direct segmented flow analysis. *Mar. Chem.* 57, 265–275.
- Kim, K.T., 1985. La salinité et la densité des eaux des étangs de Berre et de Vaine (Méditerranée nord-occidentale). Relations avec les affluents et le milieu marin voisin. *J. Nat. Sci.* 5, 221–246.
- Koroleff, F., 1970. Direct Determination of Ammonia in Natural Waters as Indophenol Blue. ICES Information on Techniques and Methods for Sea Analysis, an Interlaboratory Report 3, pp. 19–22.
- Laima, M.J.C., 1993. Recovery of $^{15}\text{NH}_4$ in labeling experiments on coastal marine sediments. *Mar. Chem.* 44, 31–42.
- Lane, R.R., Day, J.W., Day, J., 2005. Marsh Elevation Change, Accretion, and Subsidence at Three Louisiana Coastal Wetlands Receiving Diverted Mississippi River Water. *Wetlands* (26) pp. 1130–1142.
- Laverman, A.M., Canavan, R.W., Slomp, C.P., Van Cappellen, P., 2007. Potential nitrate removal in a coastal freshwater sediment (Haringvliet Lake, The Netherlands) and response to salinization. *Water Res.* 41, 3061–3068.
- Lohse, L., Malschaert, J.F.P., Slomp, C.P., Helder, W., Van Raaphorst, W., 1993. Nitrogen cycling in North Sea sediments: interaction of denitrification and nitrification in offshore and coastal areas. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 101, 283–296.
- Magalhaes, C.M., Joye, S.B., Moreira, R.M., Wiebe, W.J., Bernaldo, A.A., 2005. Effect of salinity and inorganic nitrogen concentrations on nitrification and denitrification rates in intertidal sediments and rocky biofilms of the Douro River estuary Portugal. *Water Res.* 39, 1783–1794.
- Mars, P., 1949. Contribution à l'étude biologique des étangs méditerranéens. Quelques aspects de l'évolution de l'étang de Berre. *Bullet. Soc. Linnéenne Provence* 17, 8–16.
- Mars, P., 1966. Recherches sur quelques étangs du littoral méditerranéen français et sur leurs faunes malacologiques. *Vie Milieu* 20, 1–359.
- Minas, M., 1973. Synthèse et dégradation de la matière organique dans l'écosystème de l'étang de Berre, dynamique et bilan, rapport avec le régime hydrologique. Doctoral thesis, University of Aix-Marseille, France.
- Minas, M., 1974. Distribution, circulation et évolution des éléments nutritifs, en particulier du mécanisme de l'eutrophisation dans l'étang de Berre. *Ann. l'Institut Océanogr.* 52, 153–161.
- Minas, M., Bonin, M.C., Coste, B., David, P., Minas, H.J., 1976. Caractère particulier du mécanisme de l'eutrophisation dans l'étang de Berre. *Ann. l'Institut Océanogr.* 52, 153–161.
- Minjeaud, L., Bonin, P., Michotey, V.D., 2008. Nitrogen fluxes from marine sediments: quantification of the associated co-occurring bacterial processes. *Biogeochemistry* 90, 141–157.
- Minjeaud, L., Michotey, V.D., Garcia, N., Bonin, P., 2009. Seasonal variation in di-nitrogen fluxes and associated processes (denitrification, anammox and nitrogen fixation) in sediment subject to shellfish farming influences. *Aquat. Sci.* 71, 425–435.
- Mulholland, P.J., 2008. Stream denitrification across biomes and its response to anthropogenic nitrate loading. *Nature* 452, 202–205.
- Nerini, D., Mante, C., Burbec, J.P., Garcia, C., 2001. Une méthode statistique de détermination de séquences caractéristiques dans une série temporelle de plusieurs variables. Application à la physico-chimie des eaux de l'étang de Berre. *Eur. Plan. Sci.* 332, 457–464.
- Nielsen, L.P., 1992. Denitrification in sediment determined from nitrogen isotope pairing. *FEMS Microb. Ecol.* 86, 357–362.
- Nielsen, K., Risgaard-Petersen, N., Somod, B., Rysgaard, S., Bergo, T., 2001. Nitrogen and phosphorus retention estimated independently by flux measurements and dynamic modeling in the estuary, Randers Fjord, Denmark. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 219, 25–40.
- Nishio, T., Koike, I., Hattori, A., 1983. Estimates of denitrification and nitrification in coastal and estuarine sediments. *Appl. Environ. Microb.* 45, 444–450.
- Nixon, S.W., 1981. Remineralization and nutrient cycling in coastal marine ecosystems. In: *Nutrient Enrichment in Estuaries*, B.N.A. Cronin. Clifton: Humana.
- Paerl, H.W., Dennis, R.L., Whitall, D.R., 2002. Atmospheric deposition of nitrogen: implications for nutrient overenrichment of coastal waters. *Estuaries* 25, 677–693.
- Rysgaard, S., Risgaard-Petersen, N., Sloth, N.P., 1996. Nitrification, denitrification, and nitrate ammonification in sediments of two coastal lagoons in Southern France. *Hydrobiologia* 329, 133–141.
- Rysgaard, S., Thastum, P., Dalsgaard, T., Christensen, P.B., Sloth, N.P., 1999. Effects of salinity on NH_4^+ adsorption capacity, nitrification, and denitrification in Danish estuarine sediments. *Estuaries* 22, 21–31.
- Schachter, D., 1954. A propos d'une pollution accidentelle de l'étang de Berre provoquée par un déversement massif d'hydrocarbures. Rapport et Procès verbaux des Réunions de la Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée, 12, 251–254.
- Schlesinger, W.H., 1997. *Biogeochemistry*, second ed. Academic Press, San Diego, California.
- Seitzinger, S.P., 1988. Denitrification in freshwater and coastal marine ecosystems: ecological and geochemical significance. *Limnol. Oceanogr.* 33, 702–724.
- Seitzinger, S.P., 2008. Nitrogen cycle out of reach. *Nature* 425, 162–163.
- Seitzinger, S.P., Kroeze, C., Bouwman, A.F., Caraco, N., Dentener, F., Styles, R.V., 2002. Global patterns of dissolved inorganic and particulate nitrogen inputs to coastal systems: recent conditions and future projections. *Estuaries* 25, 640–655.
- Smith, V.H., Joye, S.B., Howarth, R.W., 2006. Eutrophication of freshwater and marine ecosystems. *Limnol. Oceanogr.* 51, 351–355.
- Stora, G., Arnoux, A., 1988. Effects on Mediterranean lagoon macrobenthos of a river diversion: assessment and analytical review. In: El-Sabb, M.I., Murty, T.S. (Eds.), *Nat. Man-Made Haz.* pp. 525–546.
- Stora, G., Arnoux, A., Galas, M., 1995. Time and spatial dynamic of Mediterranean lagoon macrobenthos during an exceptionally prolonged interruption of freshwater inputs. *Hydrobiologia*, 300–301.
- Thamdrup, B., Dalsgaard, T., 2002. Production of N_2 through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. *Appl. Environ. Microb.* 68, 1312–1318.
- Tréguer, P., Lecorre, P., 1975. Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer. Lab. Océanogr. Chim. Univ., Bretagne Occid., Brest, 110p.
- Vahtera, E., Conley, D.J., Gutfasson, B.G., Kuosa, H., Pitkanen, H., Savchuk, O.P., Tamminen, T., Viitasalo, M., et al., 2007. Internal ecosystem feedbacks enhance nitrogen-fixing cyanobacteria blooms and complicate management in the Baltic Sea. *Ambio* 36, 186–194.
- Valiela, I., Collins, G., Kremer, J., Lajtha, M., Geist, M., Seely, B., Brawley, J., Sham, C.H., 1997. Nitrogen loading from coastal watersheds to receiving estuaries: review of methods and calculation of loading to Waquoit Bay. *Ecol. Appl.* 7, 358–380.

Please cite this article in press as: Zaghmouri, I., et al. Trends in salinity and inorganic nitrogen compounds in the Berre lagoon (1994–2011) bacterial activities and nitrogen budgets. *Mar. Pollut. Bull.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.11.046>

ARTICLE IN PRESS

I. Zaghmouri et al. / Marine Pollution Bulletin xxx (2012) xxx–xxx

11

Van de Graaf, A.A., de Bruijn, P., Robertson, L.A., Jetten, M.S.M., Kuenen, J.G., 1997. Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of ^{15}N studies in a fluidized bed reactor. *Microbiologia* 143, 2415–2421.

Zehr, J.P., Kudela, R.M., 2011. Nitrogen cycle of the open ocean: from genes to ecosystems. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 3, 197–225.

Zillén, L., Conley, D., Andrén, T., Andrén, E., Björck, S., 2008. Past occurrences of hypoxia in the Baltic Sea and the role of climate variability, environmental change and human impact. *Ear. Sci. Rev.* 91, 77–92.

Please cite this article in press as: Zaghmouri, I., et al. Trends in salinity and inorganic nitrogen compounds in the Berre lagoon (1994–2011) bacterial activities and nitrogen budgets. *Mar. Pollut. Bull.* (2012). <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.11.046>