

2m11.3510.7

Université de Montréal

**Influence de l'espèce de macrophyte sur la densité et l'activité microbienne en marais  
filtrant artificiel**

par  
Vincent Gagnon

Institut de recherche en biologie végétale  
Département de sciences biologiques  
Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

Février, 2007

© Vincent Gagnon, 2007





## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Influence de l'espèce de macrophyte sur la densité et l'activité microbienne en marais  
filtrant artificiel**

présenté par:  
Vincent Gagnon

a été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Roxane Maranger  
présidente rapporteuse

Dr. Jacques Brisson  
directeur de recherche

Dr. Marc St-Arnaud  
membre du jury

## Résumé

On suppose souvent que la présence de plantes en marais artificiel permet une meilleure performance épuratoire, car la rhizosphère stimulerait les communautés microbiennes. Cependant, l'interaction entre les plantes et les microorganismes ne reste qu'en partie comprise. Le but du projet était d'évaluer la densité et l'activité microbienne associée à la rhizosphère de *Phalaris arundinacea*, *Phragmites australis* et *Typha angustifolia*. Nos résultats ont montrés que la présence de plantes augmente la densité et l'activité microbienne, avec des valeurs statistiquement plus élevées pour *Phalaris*. Le taux de respiration aérobie était plus élevé dans les microcosmes plantés, suggérant ainsi l'oxygénation du milieu par le système racinaire. La densité et l'activité microbienne ont été corrélées à la surface racinaire et les microorganismes étaient principalement présents sur le sable et les racines. La morphologie et la période d'établissement des espèces de plantes semblent être un facteur important influençant l'interaction entre les plantes et les microorganismes.

## Mots clés

Microcosme; protéine; activité enzymatique totale; déshydrogénase; respiration; rhizosphère; surface racinaire

## **Abstract**

It is often assumed that the presence of plants in constructed wetlands allows a better wastewater treatment, mainly because plant rhizospheres stimulate microbial communities. Yet, fundamental interactions between plants and associated microorganisms remain only partly understood. The aim of our project was to evaluate microbial density and activity associated to the rhizosphere of *Phalaris arundinacea*, *Phragmites australis* and *Typha angustifolia*. Our results have shown that the presence of plants enhance microbial density and activity, with significantly higher values associated with *Phalaris*. Aerobic respiration rate were greater in planted microcosms, suggesting root oxygen release. In addition, microbial density and activities was positively correlated to root surface and were mainly present on the sand and roots. Plant species morphology and establishment period seem to be a key factor influencing microbial-plant interaction.

## **Keywords**

Microcosm; protein; total enzymatic activities; dehydrogenase; respiration; rhizosphere; root surface

## Table des matières

Résumé .....	iii
Abstract .....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures .....	viii
Liste des annexes.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Liste des abréviations et des acronymes .....	x
Les remerciements .....	xi
<b>Chapitre 1 : Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
1.1 Des marais naturels aux marais artificiels.....	1
1.2 Types de marais artificiel.....	1
1.2.1 Marais surfacique à flux horizontal .....	2
1.2.2 Marais à flux vertical .....	3
1.2.3 Marais sous surfacique à flux horizontal .....	4
1.3 Types de polluants traités en marais artificiel.....	5
1.4 Principaux processus d'épuration des eaux au sein des marais artificiels.....	6
1.4.1 Processus physiques.....	6
1.4.2 Processus chimiques .....	6
1.4.3 Processus biologiques .....	6
1.5 Les microorganismes et l'épuration des eaux dans les marais artificiels.....	7
1.5.1 La biodégradation par les enzymes extracellulaires.....	7
1.5.2 La biodégradation via la respiration et la fermentation microbienne .....	8
1.5.2 Facteurs influençant les microorganismes .....	10
1.5.2.1 Influence de la disponibilité des accepteurs d'électrons.....	10
1.5.2.2 Influence de la température .....	11
1.5.2.3 Influence du pH.....	11
1.5.2.4 Influence de la charge et de la nature des effluents .....	12
1.6 Influence de la présence de plantes sur les microorganismes.....	12
1.6.1 Les effets bénéfiques de la rhizosphère .....	14
1.6.1.1 La rhizodéposition.....	14
1.6.1.2 Apport d'oxygène par les plantes.....	15
1.6.1.3 Surface racinaire et croissance bactérienne.....	17
1.7 Influence de l'espèce de plante sur les microorganismes .....	17
1.8 Installation expérimentale et limites des méthodes d'analyses.....	18
1.8.1 L'utilisation de microcosmes .....	19
1.8.2 Mesure de la densité microbienne par cytométrie en flux .....	20

1.8.3 Mesure de la quantité de protéines.....	21
1.8.4 Mesure de l'activité de déshydrogénase .....	21
1.8.5 Mesure de l'activité enzymatique totale .....	22
1.8.6 Mesure de la respiration aérobie .....	23
1.9 Hypothèses et objectifs de recherche .....	23
1.10 Organisation et contenu du mémoire .....	25
1.11 Apport de l'étudiant à la maîtrise et de ses coauteurs à l'article.....	26
<b>Chapitre 2: Influence of macrophyte species on microbial density and activity in constructed wetlands.....</b>	<b>27</b>
2.1 Abstract .....	27
2.2 Introduction.....	28
2.3 Methods.....	29
2.4 Results and discussion .....	32
2.4.1 Influence of plant presence on microbial density and activity.....	32
2.4.2 Influence of plants species on microbial density and activity.....	34
2.4.3 Plant species' influence on microbial spatial distribution.....	35
2.5 Conclusion .....	38
2.6 Acknowledgements .....	38
<b>Chapitre 3: Conclusion générale .....</b>	<b>39</b>
<b>Références .....</b>	<b>42</b>



**Liste des tableaux**

Tableau 1.1 : Les divers catabolismes et leurs réactions .....	8
Tableau 2.1 : Total microbial density and activity in planted (mean of all species) and unplanted microcosms.....	32
Tableau 2.2 : Plant species biomass and shoot numbers for the first growth season.....	34

**Liste des figures**

Figure 1.1 : Vue en coupe d'un marais surfacique à flux horizontal .....	2
Figure 1.2 : Vue en coupe d'un marais à flux vertical. ....	3
Figure 1.3 : Vue en coupe d'un marais sous surfacique à flux horizontal .....	4
Figure 1.4 : Cycle de l'azote en marais filtrant artificiel .....	9
Figure 1.5 : Potentiel redox et les divers types de respirations et de fermentations .....	10
Figure 1.6 : Variation du potentiel redox et de la quantité d'oxygène selon la distance d'une racine en marais artificiel.....	15
Figure 2.1 : Microcosm design illustrating section and zone separation .....	29
Figure 2.2 : Microbial densities, activities and root surface per microcosm depending on depth.....	33
Figure 2.3 : Localisation of microbial density and activity per microcosm.....	36

## Liste des annexes

<b>Annexe 1 : Revue de la littérature</b> .....	xiii
<b>Annexe 2 : Installation expérimentale et zones d'échantillonnage</b> .....	xiv
A2.1 Installation expérimentale .....	xiv
A2.2 Description du microcosme.....	xv
A2.3 Macrophytes utilisés.....	xvi
A2.4 Alimentation des microcosmes .....	xvi
A2.5 Échantillonnages .....	xvi
<b>Annexe 3 : Protocoles d'analyses expérimentales</b> .....	xx
A3.1 Mesure de la matière sèche et volatile .....	xx
A3.2 Mesure de la quantité de protéines.....	xx
A3.3 Mesure de la densité microbienne par cytométrie en flux .....	xxi
A3.4 Mesure de l'activité de déshydrogénase.....	xxi
A3.5 Mesure de l'activité enzymatique .....	xxiii
A3.6 Mesure du potentiel de la respiration aérobie .....	xxiv
<b>Annexe 4 : Compilation des données expérimentales</b> .....	xxv
A4.1 Matière sèche et volatile, Protéines et densité microbienne.....	xxv
A4.2 Activité enzymatique, déshydrogénase et taux de respiration aérobie.....	xxx
A4.3 Localisation des microorganismes : Densité microbienne et protéines ..	xxxvi
A4.4 Localisation des microorganismes : Activité enzymatique, déshydrogénase et taux de respiration aérobie.....	xxxvii
A4.5 La biomasse souterraine et la surface racinaire.....	xxxviii
A4.6 Biomasse aérienne, nombre et hauteur de tiges .....	xxxix
<b>Annexe 5 : Analyse de variance (ANOVA) et les comparaisons multiples</b> <b>de Tukey pour des différences entre les moyens</b> .....	xl
A5.1 Protéines.....	xl
A5.2 Déshydrogénase .....	xliii
A5.3 Activité enzymatique totale.....	xlvi
A5.4 Taux de respiration aérobie .....	xlix
A5.5 Densité de bactéries.....	lii

## Liste des abréviations et des acronymes

<b>Abréviations et acronymes*</b>	<b>Définitions françaises</b>	<b>Définitions anglaises</b>
(ANAMMOX)	Oxydation anaérobie de l'ammonium	Anaerobic ammonia oxidation
(ANOVA)	Analyse de variance	Analysis of variance
ATK (TKN)	Azote total Kjeldahl	Total Kjeldahl nitrogen
BCA	Acide bicinchoninique	Bicinchoninic Acid
°C	Degré Celsius	Degree Celsius
CFU	Colonie formant unité	Colony-forming unit
CTC	5-Cyano-2,3-Tolyl-Tetrazolium Chloride	5-Cyano-2,3-Tolyl-Tetrazolium Chloride
DBO (BOD)	Demande biologique en oxygène	Biological oxygen demand
DCO (COD)	Demande chimique en oxygène	Chemical oxygen demand
(DGGE)	Électrophorèse en gradient de gel dénaturant	Denaturing gradient gel electrophoresis
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique	Ethylenediaminetetraacetic acid
Eh	Potentiel d'oxydation et de réduction	Oxidation and reduction potential
FDA	Fluorescéine diacétate	Fluorescein diacetate
INT	Iodonitro-Tetrazolium	Iodonitro-Tetrazolium
INT-F	Iodonitro-Tetrazolium Formazan	Iodonitro-Tetrazolium Formazan
MES (TSS)	Matière en suspension	Total suspended solid
mV	Milli Volt	Milli Volt
Ø	Diamètre des pores d'un filtre	Filter pore size
pH	Potentiel d'hydrogène	Potential of hydrogen
Potentiel redox	Potentiel d'oxydation et de réduction	Oxidation and reduction potential
(RFLP)	Polymorphisme de longueur des fragments de restriction	Restriction fragment length polymorphism
(St. dev.)	Écart-type	Standard deviation

\* Forme anglaise mise entre parenthèses

## Les remerciements

Je voudrais tout d'abord souligner les hasards de ma vie qui m'ont conduit au moment présent, à l'écriture ce mémoire. Tout d'abord mentionnons le mélange aléatoire de chromosomes provenant de deux personnes extraordinaires, mes parents. Je les remercie pour tout le support qu'ils m'ont donné au cours de mes études. Un gros merci à un accident naturel, qui au premier stade embryonnaire a divisé l'amas de cellules pour créer un clone, mon frère jumeau, pour qui je suis très reconnaissant pour son soutien et sa compagnie. Mille fois merci pour l'heureuse rencontre avec une femme merveilleuse, dont la beauté, l'intelligence et la bonté d'âme me comble de joie et avec qui la complicité symbiotique rend ma vie si formidable. Merci à l'heureux hasard qui a permis de croiser existence de mon directeur de recherche, pour qui j'ai une admiration infinie pour son intelligence, son jugement, son humour, mais surtout pour sa grande écoute et sa compréhension. Je voudrais aussi saluer le post doctorat de notre laboratoire avec qui j'ai appris mille et une choses et qui, en plus d'être incroyablement sympathique, est un chercheur de génie. Je voudrais aussi souligner le support financier du CRSNG et de la SORDAC, qui par leur subvention ont permis la réalisation de cette recherche. Finalement, je voudrais vous remercier cher lecteur et lectrice, car par votre action vous faite revivre deux ans de travail passionnant, qui grâce à vous ne tomberons pas dans l'oublie et restera dans la mémoire collective.

*L'existant est composé des choix infinis que le hasard nous offre.*

*V.* ,2006

Merci à vous tous ...

Réjean Gagnon (Père)

Christiane Gagnon (Mère)

Julien Gagnon (Frère)

Danie Ouellette (Conjointe)

Jacques Brisson (Directeur de recherche)

Florent Chazarenc (Post doctorat)

Yves Comeau (Chercheur)

Marie-Ève Bellavance (Amie)

Marilyne Tremblay-Coutu (Amie)

Carole Radix (Assistante de recherche)

Stéphane Daigle (Statisticien)

Jean-François Dallaire (Stagiaire)

Denis Lauzer (Agent de recherche)

David Morse (Chercheur)

Denis Bouchard (Technicien)

Gabriel Teodorescu (Horticulteur)

Laurenne Michelle (Amie)

Caroline Ruh (Amie)

# **Chapitre 1 : Introduction générale**

## **1.1 Des marais naturels aux marais artificiels**

Depuis plus d'une centaine d'années, les marais naturels ont servi de site pour le déversement des eaux usées mais ce n'est qu'autour des années 1960 que le potentiel épuratoire des marais naturels a commencé à être reconnu (Seidel, 1976; Kadlec et Knight, 1996). Cette capacité de filtration des eaux vient du fait que les marais sont des écosystèmes naturellement adaptés à la transformation et au recyclage de la matière (Faulkner, 2004). Inspirés des marais en milieu naturel, les marais artificiels (ou *constructed wetlands* en anglais) sont des écosystèmes recréés par l'homme afin de traiter une large gamme d'eaux usées, dont des effluents municipaux, industriels et agricoles. Élaborée dans les années 1960, cette technologie a commencé à être mise au point par les recherches du docteur Seidel de l'Institut Max Planck en Allemagne (Seidel, 1976; Kickuth, 1977). Mettant à profit les interactions entre les plantes, les microorganismes et le sol, les marais artificiels sont des systèmes autosuffisants, nécessitant peu d'énergie et offrant une solution durable à l'épuration des eaux (Werker *et al.*, 2002; Stottmeister *et al.*, 2003). De plus, comparativement aux procédés traditionnels, les marais artificiels ont un faible coût d'installation et d'exploitation, une facilité d'utilisation ainsi qu'une bonne intégration dans le paysage (Brix, 1994; Liang *et al.*, 2003).

## **1.2 Types de marais artificiel**

Contrairement aux marais en milieu naturel, les marais artificiels sont des systèmes spécialement conçus et optimisés pour l'épuration des eaux usées (Vymazal *et al.*, 1998). Il existe donc plusieurs sortes de marais artificiels, qui peuvent être classés selon trois types d'architectures.

### 1.2.1 Marais surfacique à flux horizontal

Ce type de marais est caractérisé par un bassin d'eau libre dont les plantes peuvent être flottantes ou enracinées en fond de bassin (Figure 1.1 a-b). Le marais est dit surfacique à flux horizontal, puisque l'eau passe principalement au dessus de la surface du sol et le flux se fait horizontalement de l'entrée vers la sortie du bassin. Ce système a comme inconvénient l'utilisation d'une plus grande superficie de terrain comparativement aux autres types de marais artificiels (Kadlec *et al.*, 2000). De plus, l'implantation de ce type de système en climat froid peut être problématique à cause du gel du bassin en hiver.

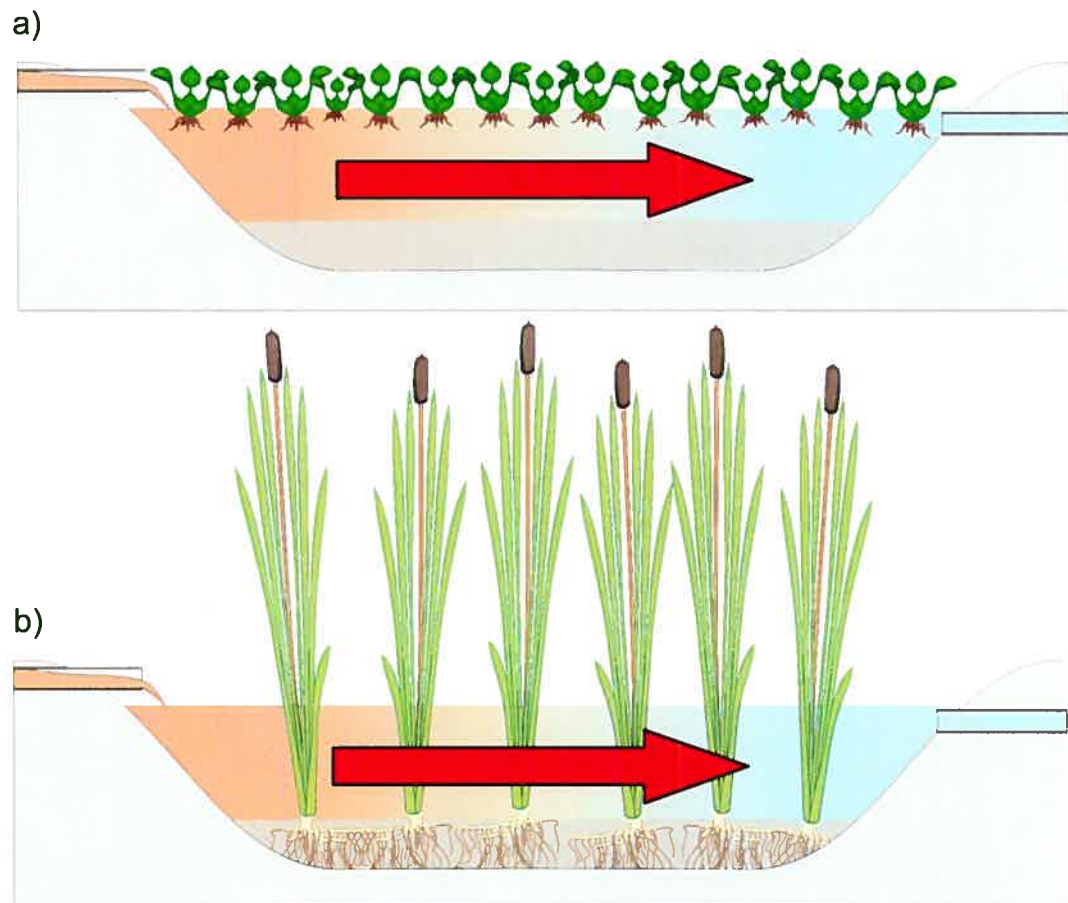


Figure 1.1 : Vue en coupe d'un marais surfacique à flux horizontal

### 1.2.2 Marais à flux vertical

Ce type de marais est constitué d'un lit de sable ou gravier, dont l'apport en effluent se fait verticalement par la percolation du polluant au travers de la matrice plantée (Figure 1.2). Puisque le système n'est pas saturé d'eau, l'effluent est oxygéné par son passage dans le gravier, ce qui favorise la biodégradation des polluants. Toutefois, l'épuration peut être limitée par l'absence de zones anaérobies nécessaires pour certains processus de biodégradation. Ce type de marais artificiel a l'avantage d'être le plus efficace, puisque qu'il nécessite une petite superficie de terrain pour le même niveau d'épuration (Kadlec *et al.*, 2000). Cependant, les marais à flux verticaux sont susceptibles au gel en climat froid dû à la pénétration de l'air ambiant dans la matrice plantée, ainsi qu'au gel de la tuyauterie lors de l'alimentation.

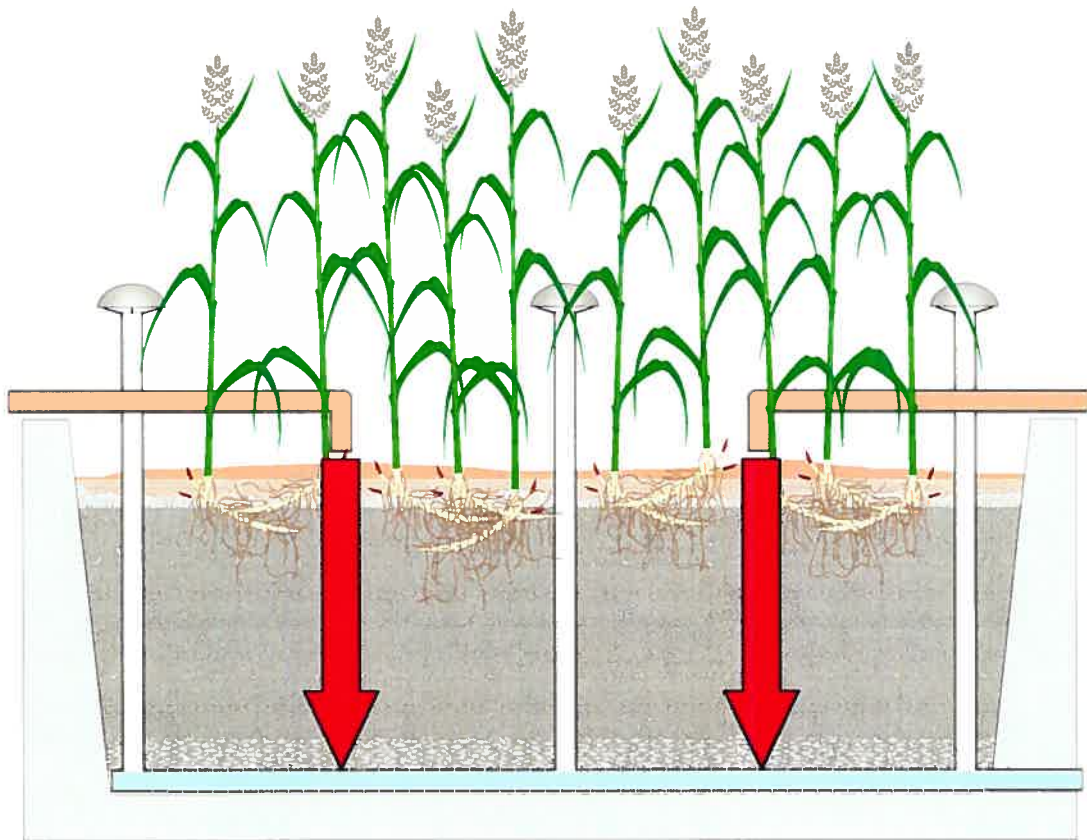


Figure 1.2 : Vue en coupe d'un marais à flux vertical



### 1.2.3 Marais sous surfacique à flux horizontal

Ce type de marais est constitué d'un lit de gravier enraciné de plantes et dont l'apport en effluent se fait par écoulement horizontal sous la surface du marais (Figure 1.3). Les marais sous surfaciques horizontaux sont généralement considérés comme des milieux anaérobies comprenant des zones d'anoxies et d'aérobies. Par contre, l'oxygène est souvent l'un des facteurs limitant pour l'épuration de certains polluants. Ce type de système peut être utilisé en climat froid, car l'effluent passe sous la surface du marais et est ainsi protégé contre les basses températures de l'atmosphère (Wallace *et al.*, 2001).

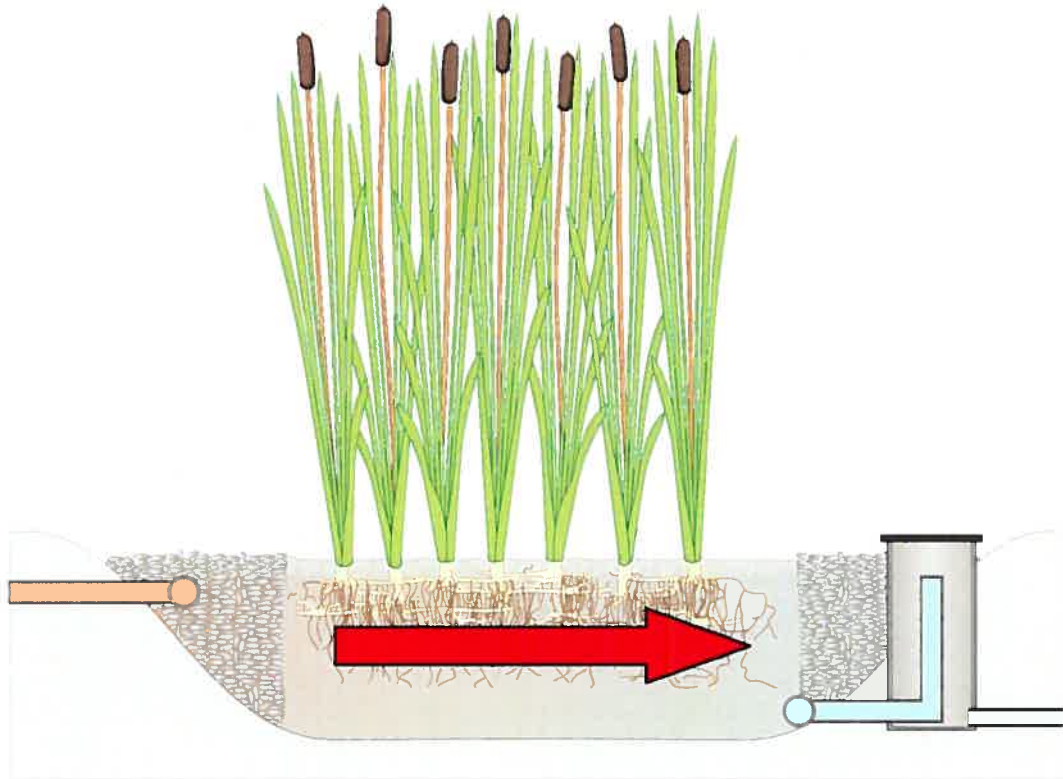


Figure 1.3 : Vue en coupe d'un marais sous surfacique à flux horizontal

Cette recherche s'est concentrée sur les marais de type sous surfacique à flux horizontal, car ce procédé est préconisé dans les zones de climats froids comme au Canada. Les explications subséquentes seront donc orientées sur ce type de marais artificiel.

### 1.3 Types de polluants traités en marais artificiel

Les eaux usées proviennent principalement des effluents municipaux, industriels et agricoles et leurs compositions peuvent varier considérablement. Les principales classes de contaminant et leur conséquence sur l'environnement sont présentées dans les points suivants (Metcalf et Eddy, 1991) :

- **Matière en suspension** : Les matières en suspension (MES), lorsque déversées dans l'environnement aquatique, peuvent s'accumuler sous forme de boue et créer des conditions septiques dans le milieu.
- **Nutriments** : L'azote et le phosphore sont des nutriments essentiels pour la croissance des organismes. Toutefois, le déversement de ces nutriments dans un milieu aquatique peut entraîner la perturbation de l'écosystème et créer l'eutrophisation du milieu par la croissance excessive d'algues.
- **Matière organique biodégradable** : La matière organique se compose principalement de protéines, de glucides et de gras. Le contenu en matière organique est communément évalué par la demande biologique en oxygène (DBO) ainsi que par la demande chimique en oxygène (DCO). Si la matière organique est déchargée sans traitement dans un environnement aquatique, ce polluant entraînera un épuisement de l'oxygène présent dans le milieu et l'asphyxie de la faune aquatique.
- **Matière organique réfractaire** : Ce type de polluant est considéré comme peu biodégradable. Par exemple, les surfactants, les phénols et les pesticides sont de cette catégorie.
- **Métaux lourds** : Les métaux lourds sont principalement de provenance industrielle et commerciale. Notamment, les effluents peuvent être contaminés par l'arsenic, le sélénium, le plomb, le cadmium, le mercure, etc.
- **Pathogènes** : Les microorganismes pathogènes (*Escherichia coli*, *Salmonella*, etc.) peuvent causer des problèmes d'ordre sanitaire si déversé directement dans le milieu.

L'effluent utilisé lors de cette étude était d'origine piscicole et ne présentait pas de matière organique réfractaire ou de métaux lourds. L'effluent était constitué principalement de matière en suspension, de nutriments et de matière organique biodégradable. Dans le reste de ce document le terme général de « polluant » désignera donc ces composés.

## **1.4 Principaux processus d'épuration des eaux au sein des marais artificiels**

Il est couramment admis que l'épuration des eaux usées dans les marais artificiels se fait selon une combinaison de processus physiques, chimiques et biologiques (Gersberg *et al.*, 1986; Brix, 1987; Jenssen *et al.*, 1993; Stottmeister *et al.*, 2003).

### **1.4.1 Processus physiques :**

Lors du passage d'une eau usée au travers d'un marais artificiel, l'abattement des matière en suspension se fait par filtration grâce au gravier et aux racines ainsi que par la sédimentation des particules (Brix, 1993, 1997). De plus, certains polluants peuvent se volatiliser permettant ainsi leur épuration. Par exemple l'ammoniaque en solution peut se transformer en ammoniac gazeux qui se volatilise dans l'atmosphère (Vymazal, 2006). La photolyse est un autre processus physique, qui se déroule principalement en marais surfacique, où les radiations du soleil dégradent les polluants et éliminent les bactéries pathogènes contenues dans les eaux usées (Thullen *et al.*, 2002; Vymazal, 2005).

### **1.4.2 Processus chimiques**

Certains polluants, comme le phosphore et les métaux lourds, peuvent être adsorbés ou précipités par des composés réactifs (Fe, Al, Ca, Mg et -COOH) (Reedy et D'Angelo, 1997). Cependant, due à la saturation dans le temps des sites de réaction, l'efficacité de ce mécanisme diminue avec l'âge du système (Kadlec *et al.*, 2000). De plus, la présence d'oxygène libre en marais artificiel permet l'oxydation chimique de certains composés toxiques, comme les métaux et les sulfures (Brako et Smart, 1983).

### **1.4.3 Processus biologiques**

La végétation en marais artificiel permet la bioaccumulation de certains polluants (N, P, Pb, Cu, Zn, Cd), qui seront enlevés par la fauche saisonnière de la biomasse aérienne (Brix, 1997). Cependant, cette rétention des polluants dans la partie aérienne des plantes

est relativement faible et représente des valeurs inférieures à 10% de l'azote, 15% du phosphore et 30% des métaux apportés annuellement par l'effluent (Gersberg *et al.*, 1985; Shutes *et al.*, 1993; Vymazal *et al.*, 1999; Vymazal, 2001). Puisque la bioaccumulation par les plantes reste faible, il est reconnu que l'épuration en marais artificiel se fait principalement par l'action des microorganismes (Hatano *et al.*, 1993).

En définitive, le rôle des microorganismes en marais artificiel est très important, puisqu'ils permettent la biodégradation d'une majorité de polluants, dont certains peuvent être totalement minéralisés en CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O et N<sub>2</sub>.

### **1.5 Les microorganismes et l'épuration des eaux dans les marais artificiels**

Les microorganismes présents en marais artificiel se composent généralement de bactéries, d'algues, de mycètes et de protozoaires (Scholz *et al.*, 2001). Toutefois, les bactéries sont, de tous les microorganismes, les plus étudiées en marais artificiel. La biodégradation résulte principalement de la transformation des polluants via des enzymes extracellulaires ainsi que par la respiration et la fermentation microbienne. Dans ce chapitre, il sera question des divers types de biodégradation ainsi que des facteurs influençant l'activité et la diversité des microorganismes dans les marais artificiels.

#### **1.5.1 La biodégradation par les enzymes extracellulaires**

La biodégradation de la matière organique complexe se fait principalement via des enzymes extracellulaires (protéases, cellulases, amylases, estérases, etc.) qui hydrolysent les macromolécules en des composés de tailles facilement assimilables par les microorganismes (Gianfreda et Rao, 2004). Une fois assimilés, ces composés poursuivent leur biodégradation via la respiration microbienne (Allison et Vitousek, 2005). En outre, les enzymes extracellulaires ont un rôle important puisqu'ils catalysent la réaction initiale permettant la décomposition de la matière organique.

### 1.5.2 La biodégradation via la respiration et la fermentation microbienne

La respiration et la fermentation sont des catabolismes par lesquels les microorganismes décomposent la matière afin d'obtenir de l'énergie (Alberts et *al.*, 2001). Ce faisant, plusieurs polluants peuvent être transformés en composés généralement « moins » nocifs pour l'environnement (Tableau 1.1). Il existe trois grands types de catabolismes :

- **Respiration aérobie** : Réaction où le dioxygène ( $O_2$ ) est l'accepteur final d'électron.
- **Respiration anaérobie** : Réaction où l'accepteur final d'électron est un composé autre que le dioxygène (ex. :  $NO_2^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $CO_2$ ).
- **Fermentation** : Réaction où la matière organique est oxydée sans faire appel à la chaîne de transport d'électron.

Tableau 1.1 : Les divers catabolismes et leurs réactions

	Types de catabolisme		Réactions cataboliques
<b>Respiration aérobie</b>	Oxydation du carbone organique		Carbone organique + $O_2 \rightarrow CO_2 + H_2O$
	Nitrification	Nitritation	$NH_4^+ + O_2 \rightarrow NO_2^- + H_2O$
		Nitratation	$NO_2^- + O_2 \rightarrow NO_3^-$
<b>Respiration anaérobie</b>	Dénitrification		Carbone organique + $NO_3^- \rightarrow N_2 + CO_2 + H_2O$
	Oxydation anaérobie de l'ammonium (Anammox)		$NH_4^+ + NO_2^- \rightarrow N_2 + H_2O$
	Réduction des sulfates		Carbone organique + $SO_4^{2-} \rightarrow H_2S + CO_2 + H_2O$
	Méthanogénèse		$H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + H_2O$
<b>Fermentation</b>	Fermentation alcoolique		Carbone organique (Sucre) $\rightarrow$ Alcool + $CO_2$
	Fermentation acidique		Carbone organique (Sucre) $\rightarrow$ Acide gras + $CO_2$
	Fermentation méthanique		Carbone organique (Acetate) $\rightarrow$ $CH_4 + CO_2$

(Morel et Hering, 1993; Strous *et al.*, 1999; Kadlec *et al.*, 2000)

La biodiversité des microorganismes est importante en épuration biologique des eaux surtout en ce qui concerne la biodégradation de l'azote. En effet, la minéralisation de l'azote nécessite la combinaison de plusieurs processus générés par des espèces ou groupes d'espèces de microorganismes. D'abord l'azote organique est converti en ammonium via des bactéries aérobies, facultatives et/ou anaérobies (ammonification),

puis l'ammonium est transformé en nitrite et en nitrate, en deux étapes, en présence d'oxygène et avec l'intervention de bactéries nitrifiantes aérobies (nitrification). Finalement, la réduction de nitrate en azote gazeux, qui a lieu dans des conditions anaérobies, exige une source de carbone et l'intervention de bactéries dénitrifiantes (dénitrification) (Kadlec et Knight, 1996; Vymazal et al., 1998; Arias et al., 2005) (Figure 1.4). De plus, un nouveau type de respiration, nommé « *anaerobic ammonia oxidation* », a récemment été découvert, où l'ammonium peut être oxydé par un nitrite par des bactéries en condition anaérobie (anammox) (Mulder *et al.*, 1995).

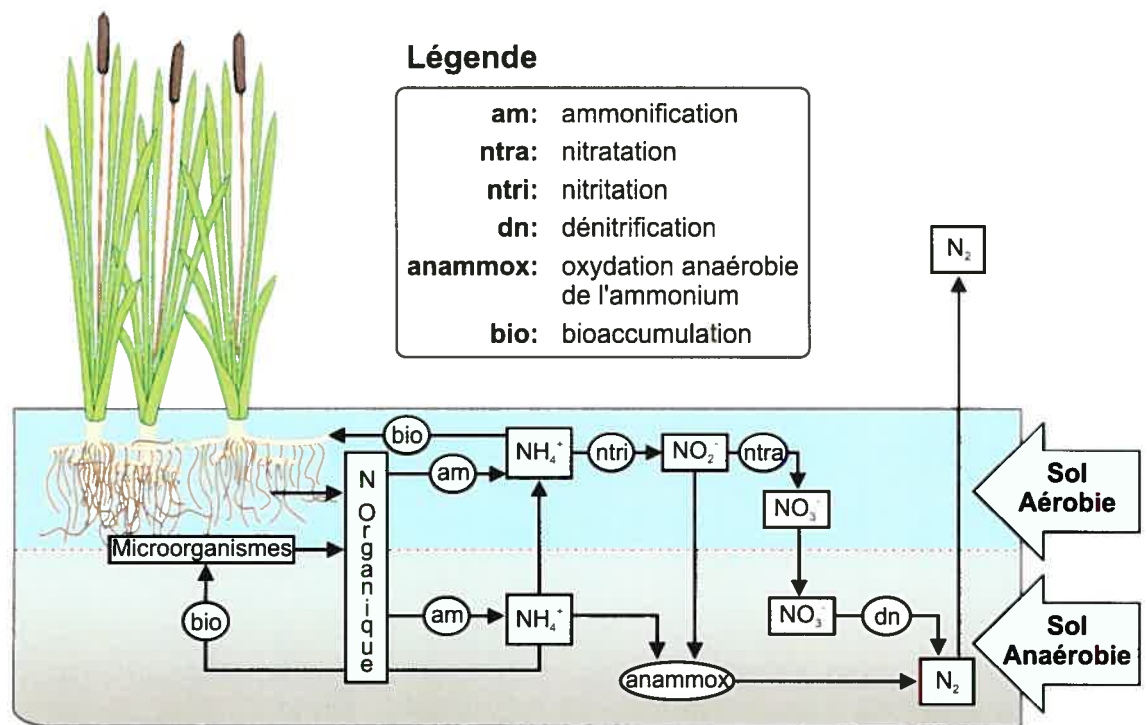


Figure 1.4 : Cycle de l'azote en marais filtrant artificiel

En définitive la diversité microbienne a une importance cruciale en marais artificiel, puisque la combinaison de plusieurs espèces de microorganismes ou de métabolismes microbiens, à l'instar de ce qui se passe avec l'azote, peut aider à la biodégradation d'une large gamme de polluants.

## 1.5.2 Facteurs influençant les microorganismes

Les conditions physiques et chimiques du milieu ont une influence importante sur l'activité et la diversité des microorganismes en marais artificiels (Kadlec et Knight, 1996). Les paramètres les plus influents sont présentés dans ce chapitre.

### 1.5.2.1 Influence de la disponibilité des accepteurs d'électrons

L'un des facteurs les plus influant est certainement la disponibilité des accepteurs finaux d'électrons pour la respiration microbienne. Cette disponibilité peut être mesurée par le potentiel d'oxydation et de réduction du milieu (potentiel redox).

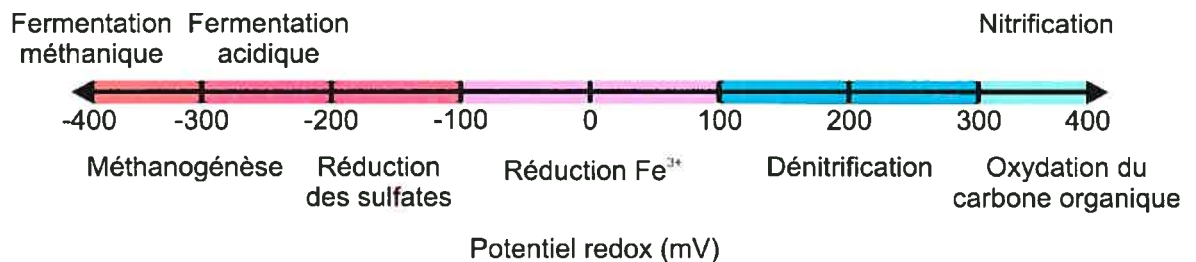


Figure 1.5 : Potentiel redox et les divers types de respirations et de fermentations (Randall *et al.*, 1992; Kadlec et Knight, 1996; Atlas et Bartha, 1997).

Lorsque le milieu est oxydé, le potentiel redox est positif et les microorganismes aérobies sont majoritaires, utilisant le dioxygène comme accepteur final d'électron. En absence de dioxygène, les conditions du milieu sont dites réduites ( $\text{redox} \leq 300 \text{ mV}$ ), et favorisent les microorganismes anaérobies capables d'utiliser d'autres types d'accepteurs finaux d'électrons (Atlas et Bartha, 1997). Enfin, lorsque le milieu est très réduit, les mécanismes de fermentation sont majoritaires (Figure 1.5). Les microorganismes dits anaérobies facultatifs peuvent être actifs sous une large gamme de potentiel redox, car ils ont la capacité d'utiliser à la fois le dioxygène ainsi que d'autres types d'accepteurs d'électrons. En outre, la diversité et l'activité microbienne peuvent donc changer dans le temps et l'espace selon la disponibilité des accepteurs d'électrons dans le milieu.

### **1.5.2.2 Influence de la température**

Un autre facteur influençant l'activité microbienne est la température du milieu. Une hausse de température se traduit généralement par une augmentation de l'activité enzymatique et donc des métabolismes associés (Atlas et Bartha, 1997). Des expériences en laboratoire ont montré que la température optimale pour l'épuration des eaux est de 30°C, tandis que la température minimale pour l'activité microbienne serait autour de 5°C (Picard *et al.*, 2005). Toutefois, le changement de communautés microbiennes pour des espèces mieux adapté aux froides températures (psychrophiles), pourrait expliquer le bon fonctionnement des marais artificiels même durant l'hiver (Werker *et al.*, 2002). De plus, les basses températures pourraient favoriser les métabolismes aérobies, puisque la concentration en oxygène dissous augmente lorsque la température baisse de 20 à 0 °C (Kadlec et Knight, 1996). Il a été observé, en marais artificiel, que même si l'ensemble de l'activité microbienne diminuait pendant les mois d'hiver, le nombre total de bactéries actives augmentait durant cette période (Jenssen *et al.*, 1993). Toutefois les résultats observés en milieu naturel tendent à démontrer le contraire avec une plus grande densité de bactéries actives lorsque les températures sont plus élevées (Sommarugal et Conde, 1997).

### **1.5.2.3 Influence du pH**

Le pH peut avoir un effet direct sur les microorganismes en influençant l'activité enzymatique, la solubilité de certains nutriments ainsi que la mobilité de métaux lourds potentiellement toxiques aux microorganismes (Atlas et Bertha, 1997). De plus, la plupart des microorganismes ne peuvent tolérer des pH extrêmes, dû à la dénaturation de leur membrane cellulaire. Dans les marais artificiels le pH des effluents domestiques se trouve généralement autour de la neutralité (pH 6,5 à 7,5), ce qui est favorable aux processus de biodégradation, comme la nitrification et la dénitrification. Cependant, certains effluents



industriels font exception, par exemple ceux provenant du drainage des mines, qui peuvent avoir un pH extrêmement acide (Kadlec et Knight, 1996).

#### ***1.5.2.4 Influence de la charge et de la nature des effluents***

La charge imposée ainsi que la nature de l'effluent à traiter peut influencer grandement l'activité et la diversité métabolique des microorganismes en marais artificiel. Une forte charge en polluant organique crée une demande élevée en oxygène et rend ainsi le milieu très anaérobie. Ces conditions favorisent donc des microorganismes anaérobies engendrant des processus tel la méthanogénèse, la réduction des sulfates et la fermentation (Kadlec et Knight, 1996). La nature de l'effluent peut aussi avoir un impact sur les microorganismes, puisque l'activité microbienne dépend essentiellement de la présence de certains éléments comme le carbone et l'azote. Par exemple, il est reconnu que pour obtenir une bonne biodégradation, l'effluent doit contenir un ratio carbone sur azote (C/N) entre 20 et 30 afin de maintenir une population microbienne active. Si la quantité d'azote est trop faible dans l'effluent, les microorganismes ne pourront produire les enzymes nécessaires pour effectuer la dégradation des polluants. Au contraire, si la concentration en azote est trop élevée, particulièrement sous sa forme ammoniacale, cela pourrait inhiber la croissance microbienne (Fontenot *et al.* 2007).

#### **1.6 Influence de la présence de plantes sur les microorganismes**

De nombreuses études ont confirmé que la présence de plantes en marais artificiels permettait d'obtenir une meilleure épuration des eaux (Gersberg *et al.*, 1986; Zhu et Sikora, 1995; Fraser *et al.*, 2004; Picard *et al.*, 2005). Cette effet positif des plantes peut être attribuable à plusieurs facteurs dont : la stabilisation du lit de gravier par le système racinaire, le maintien des performances d'écoulement, l'isolation du marais contre le gel en hiver ainsi que la bioaccumulation de polluants au sein des tissus (bien que restreinte)

(Brix, 1997). Toutefois, l'effet le plus important des plantes serait de favoriser l'établissement des communautés microbiennes responsables de la biodégradation des polluants. Il a été rapporté que la densité microbienne était supérieure dans les systèmes plantés comparativement aux témoins non plantés. Par exemple, il a été dénombré, par culture microbienne, une densité moyenne de  $2.7 \times 10^6$  CFU par gramme de gravier en marais artificiels plantés comparativement à  $3.9 \times 10^5$  CFU par gramme de gravier dans les témoins non plantés (Hatano *et al.*, 1993). Une autre étude, effectuée en microcosme, montre la même tendance avec  $3.2 \times 10^9$  bactéries par gramme de gravier dans les microcosmes plantés et  $2.5 \times 10^8$  bactéries par gramme de gravier dans les non plantés, lorsque compté par microscopie à fluorescence (Münch *et al.*, 2005). L'activité microbienne serait aussi plus importante lorsque les plantes sont présentes, puisqu'il a été montré que l'activité enzymatique responsable de la nitrification et de dénitrification était plus élevée en microcosme planté comparativement au témoin non planté (Münch *et al.*, 2005). De plus, la présence de plantes aurait aussi une influence sur la diversité microbienne, tant au point de vue de la composition des communautés microbiennes (Baptista *et al.*, 2003; Vacca *et al.*, 2005) que de la diversité métabolique des microorganismes (Collins *et al.*, 2004; Osem *et al.*, 2007).

Cependant, il faut noter que beaucoup d'incertitude persiste, car très peu d'études ont été effectuées sur l'influence des plantes sur les microorganismes en marais artificiel (Tableau A1.1; Annexe 1). De plus, les résultats de ces études proviennent généralement d'échantillons de petit volume et comportent peu de vrai réplicat. Puisque la distribution des communautés microbiennes en marais artificiel est considérée comme très hétérogène, l'effort d'échantillonnage serait primordial pour avoir une bonne représentativité (Werker *et al.*, 2002).

### **1.6.1 Les effets bénéfiques de la rhizosphère**

Il est présumé que les plantes, par leur rhizosphère, favoriseraient l'établissement des microorganismes en leurs fournissant : de l'oxygène, une source de carbone organique ainsi qu'une surface d'attachement (Armstrong, 1964; Gersberg *et al.*, 1986; Brix *et al.*, 1994, 1997).

#### ***1.6.1.1 La rhizodéposition***

Le système racinaire des plantes relâche dans le milieu divers composés organiques et inorganiques connus sous le terme général de rhizodéposition (Lynch et Whipps, 1990; Andrews et Harris, 2000). Ces composés proviendraient des débris de cellules mortes, d'exsudats, de sécrétions, de lysats et de mucilages produits par les racines (Lynch et Whipps, 1990). Leurs quantités et compositions varieraient dans l'espace avec la majeure partie des composés carbonés étant produite dans la zone d'élongation racinaire près de la coiffe (Belnap *et al.*, 2003). Il a été estimé que le carbone contenu dans les exsudats racinaires représenterait environ 5 à 25% du carbone fixé par la photosynthèse (Kadlec *et al.*, 2000). Ce carbone organique servirait de substrat pour les microorganismes et aurait une influence favorable sur la biomasse microbienne (Stottmeister *et al.*, 2003). La rhizodéposition pourrait aussi jouer un rôle important dans l'épuration des eaux en fournissant le carbone nécessaire pour la dénitrification, particulièrement dans les eaux usées faibles en matière organique (Spieles et Mitsch, 1999). De plus, la présence d'exsudats racinaires et d'autres matières provenant de la rhizodéposition favoriserait la biodégradation de composés toxiques, tels les phénols, par les microorganismes (Moormann *et al.*, 2002). Par contre, des études ont montré que les exsudats racinaires de certaines plantes pouvaient avoir un effet anti-microbien (Vincent *et al.*, 1994). Il n'en demeure pas moins que le rôle des exsudats racinaires en marais artificiel reste spéculatif, puisque la plupart des études effectuées sur le sujet ont été faites sur des plantes dans le

domaine agricole.

### 1.6.1.2 Apport d'oxygène par les plantes

Puisque l'oxygène atmosphérique diffuse 1000 fois moins vite dans l'eau que dans l'air, les marais artificiels constituent généralement des milieux anaérobies (Kadlec et Knight, 1996). Les plantes ne peuvent normalement pas vivre sous des conditions d'inondation prolongées, dû à l'asphyxie des racines causée par le manque d'oxygène. Toutefois les macrophytes vivants en marais se sont adaptées morphologiquement en permettant le transport de l'oxygène vers le système racinaire grâce à de larges cavités à l'intérieur des tiges et des rhizomes (Brix, 1994). Ces cavités, appelées aerenchymes, permettent le transport de l'oxygène soit par la simple diffusion et/ou par des mécanismes de convection et de pressurisation de l'air vers les racines (Cronk et Fennessy, 2001). Une fraction de l'oxygène est libérée dans la rhizosphère, principalement par la région subapicale des racines ainsi qu'à la base des radicelles (Armstrong, 1979; Armstrong et Armstrong, 1988).

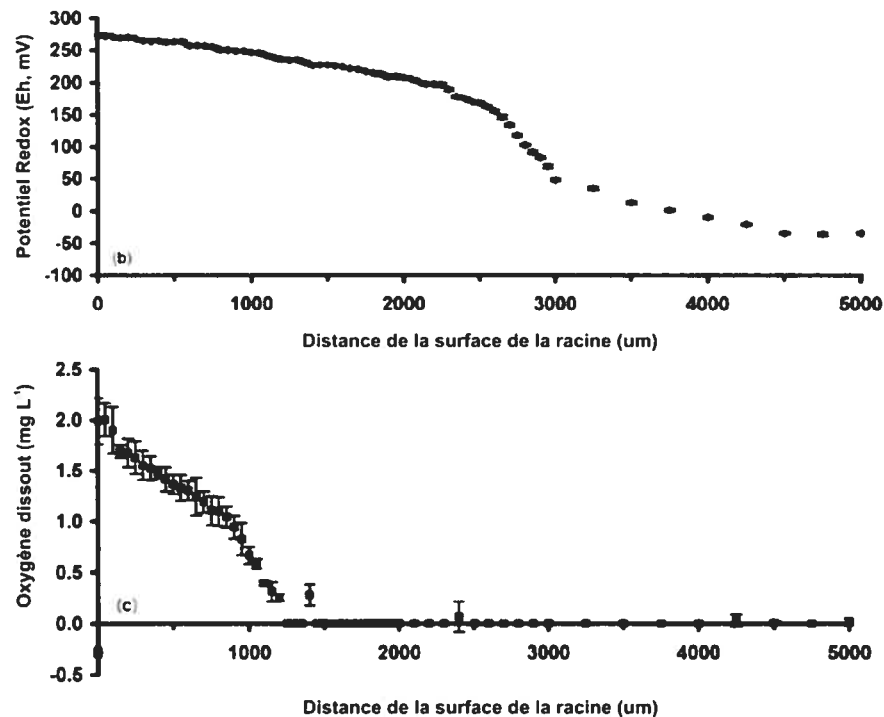


Figure 1.6 : Variation du potentiel redox et de la quantité d'oxygène selon la distance d'une racine en marais artificiel (Tiré de Bezbaruah et Zhang, 2004)

Une étude faite par Bezbaruah et Zhang (2004) a montré que la zone oxygénée était limitée à 1 mm autour des racines et que le potentiel redox variait de  $Eh \approx +250\text{mV}$  à la surface de la racine à  $Eh \approx 0\text{ mV}$  à une distance de 5 mm de celle-ci (Figure 1.6) D'autres études indiquent que la libération de l'oxygène formerait une zone aérobie de 1 à 3 mm autour des racines, créant ainsi un gradient de potentiel redox pouvant aller d'un maximum de  $Eh \approx +500\text{mV}$  à la surface de la racine à des valeurs inférieures à  $Eh \approx -250\text{ mV}$  à distance de celle-ci (Wießner *et al.*, 2002a, 2005; Stottmeister *et al.*, 2003). Cette variation du potentiel redox dans l'espace crée une stratification de la communauté microbienne favorisant ainsi divers types de catabolismes comme la respiration aérobie des composés carbonés, la nitrification, la dénitrification, la méthanogenèse, etc. (Wiessner *et al.*, 2005). Il est à noter que les gradients de potentiel redox varient aussi temporellement de façon journalière et saisonnière (Wießner *et al.*, 2005, Stein et Hook, 2005). L'apport d'oxygène par les plantes peut aussi oxyder directement des composés phytotoxiques à proximité des racines (Stottmeister *et al.*, 2003). Il a été évalué que les diverses espèces de macrophytes en marais artificiel pouvaient libérer entre 0.02 et 12 g d'oxygène par mètre carré de marais par jour (Brix, 1997). Toutefois les bénéfices d'un apport en oxygène par les plantes restent encore l'objet d'un débat. Certaines études ont montré une bonne biodégradation aérobie de la matière organique, suggérant que l'apport en oxygène par les plantes serait suffisant (Reddy *et al.*, 1989; Watson *et al.*, 1989; Edwards et al. 2006). D'autres prétendent que l'apport en oxygène par les plantes serait insuffisant dû à la faible nitrification en marais sous surfacique, concluant ainsi que les processus anaérobies prévaudraient à l'intérieur de la rhizosphère (Kadlec et Knight, 1996; Farahbakhshazad et Morrison 1997).

### **1.6.1.3 Surface racinaire et croissance bactérienne**

Il est couramment admis que la surface racinaire favoriserait la croissance microbienne en fournissant un lieu pour l'établissement des microorganismes (Gersberg et al., 1986; Brix, 1994, 1997). Toutefois très peu d'études ont démontré clairement l'influence positive de la surface racinaire sur les communautés microbiennes en marais artificiel. Des recherches en marais artificiel, effectuées par Kyambadde *et al.* (2004), ont montré que *Cyperus papyrus* L. avait une plus grande surface racinaire que *Miscanthidium violaceum* ainsi qu'une plus grande densité de bactéries associées aux racines. Par contre, les espèces de plantes employées lors de cette étude ne sont pas communément utilisées en marais artificiel.

## **1.7 Influence de l'espèce de plante sur les microorganismes**

L'influence positive qu'ont les plantes sur les microorganismes semble varier selon l'espèce de plante utilisée. En effet, plusieurs études indiquent que le pouvoir épuratoire change considérablement selon l'espèce de plante présente dans le marais artificiel (Coleman *et al.*, 2001; Fraser *et al.*, 2004; Picard *et al.*, 2005; Stein et Hook, 2005). Puisque le principal rôle des plantes serait de favoriser le développement de microorganismes, on peut supposer que la variation du niveau d'épuration serait en partie causée par une différence dans les communautés microbiennes associées à la rhizosphère de chacune des espèces.

Une plus grande densité de bactéries a été mesurée dans les marais artificiels plantés de *Phragmites australis* comparativement à ceux plantés de *Typha angustifolia*, lorsque dénombré par culture microbienne (Hatano *et al.*, 1998). De plus, une étude faite par Vymazal *et al.* (2001a) révèle que les racines de *Phragmites australis* supportaient une plus grande densité de bactéries comparativement aux racines de *Phalaris arundinacea*.

Des mesures effectuées par des analyses génétiques (DGGE, RFLP) montrent que l'espèce de plante, en milieu naturel, avait une influence directe sur la diversité microbienne associée à sa rhizosphère (Kowalchuk *et al.*, 2002). En marais artificiel, il a été montré que la diversité métabolique des microorganismes différait selon l'espèce de plante employé (Osem *et al.*, 2007). De plus, la quantité et la composition des exsudats racinaires libérés dans la rhizosphère peuvent varier selon l'espèce (Rovira, 1959; Nelson, 1990; Whipps, 2001; Rengel, 2002). Une étude faite en marais artificiel montre que la quantité de carbone organique libérée par les racines de *Phalaris arundinacea* était supérieure à *Phragmites australis*, *Scirpus atrovirens var. georgianus* et *Typha latifolia* (Zhu et Sikora, 1995). La différence en exsudat racinaire pourrait expliquer la spécificité observée entre la rhizosphère d'une espèce et ses communautés microbiennes (Marschner *et al.*, 2001, 2002; Smalla *et al.*, 2001; Kowalchuk *et al.*, 2002). Le taux d'oxygène libéré dans la rhizosphère peut aussi varier selon l'espèce de plante (Brix, 1997). Toutefois, il n'existe aucun consensus dans la littérature à savoir quelle espèce libère la plus grande quantité d'oxygène (Werker *et al.*, 2002). Comme vu précédemment, la surface racinaire spécifique à chaque espèces de plantes pourrait avoir un influence sur la densité microbienne en marais artificiel (Kyambadde *et al.* 2004).

Néanmoins, très peu d'études ont été effectuées sur l'influence des espèces de plantes sur les microorganismes en marais artificiel, particulièrement en ce qui a trait à la densité, l'activité et la diversité des communautés microbiennes (Tableau A1.1; Annexe 1).

### **1.8 Installation expérimentale et limites des méthodes d'analyses**

Comme dans toutes expériences scientifiques, les installations expérimentales ainsi que les techniques d'analyses utilisées comportent certaines limitations ainsi que des erreurs inhérentes associées à chaque type de mesure. Par conséquent, l'extrapolation des résultats

et l'élaboration de conclusions générales sur les observations expérimentales peuvent être en partie biaisées par la spécificité des méthodes et leurs erreurs associées. De ce fait, il est important de choisir avec soin le type d'installation expérimentale et d'utiliser plusieurs techniques d'analyse complémentaires afin de limiter ces biais. Ainsi, une bonne compréhension des limitations de chacune des techniques permettra de diminuer les erreurs d'interprétation et la combinaison de plusieurs techniques d'analyses permettra une meilleure évaluation des résultats. Le chapitre suivant traitera donc des avantages et des inconvénients de l'installation expérimentale ainsi que des techniques d'analyse utilisées lors de cette recherche.

### **1.8.1 L'utilisation de microcosmes**

Un microcosme est un système expérimental de petite taille représentant, de façon simplifiée, les mécanismes et phénomènes se produisant dans un système de taille réelle. Une installation expérimentale basée sur l'utilisation de microcosmes a l'avantage de pouvoir comporter de multiple réplicats, dû à la petite taille des systèmes et de leur faible coût, ce qui permet l'interprétation statistique des résultats obtenus (Eller *et al.*, 2005). De plus, l'emploi de microcosmes permet de faire des études sous des conditions environnementales contrôlées, éliminant ainsi une partie de la variabilité causée par des facteurs extérieurs autre que ceux à l'étude (Hill et Top, 1998). La nature du substrat utilisé (granulométrie, pH, matière organique, présence de nutriments) et les conditions expérimentales sous lesquelles les microcosmes sont maintenus doivent refléter, si possible, les conditions des systèmes de taille réelle. Il faut noter que l'utilisation de microcosmes a aussi des désavantages et certaines études remettent en question la représentativité des résultats et leurs extrapolations à des systèmes de taille réelle (Carpenter, 1996; Schindler, 1998). On critique principalement le fait que les



microcosmes, par leur petite taille, ne pourraient représenter l'hétérogénéité d'un sol dans tout son ensemble (Hill et Top, 1998). De plus, les microcosmes engendrent des effets de bordure importants, ce qui peut influencer les résultats et causer des biais expérimentaux (Flemer et al, 1997). Néanmoins, l'utilisation de microcosmes pour l'études des microorganismes serait appropriée, car ceux-ci évoluent à de très petites échelles et seraient moins affectés pas les biais engendrés par l'emploi de microsomes (Eller *et al.*, 2005).

### **1.8.2 Mesure de la densité microbienne par cytométrie en flux**

La cytométrie en flux est un outil qui permet, entre autre, le comptage rapide du nombre de cellules en solution, l'estimation de leur taille et de leur forme et de leur activité biochimique, avec l'emploi de certains marqueurs biologiques (SYTO-13, CTC, FDA) (Collier et Campbell, 1999; Vives-Rego *et al.*, 2000). La cytométrie en flux a l'avantage d'être un outil hautement automatisé pouvant compter rapidement plus d'une centaine de cellules à la seconde (Vives-Rego *et al.*, 2000). De plus, cette méthode est moins fastidieuse comparée au comptage par microscopie en fluorescence et plus précise que le comptage par culture microbienne (Collier et Campbell, 1999; Veal *et al.*, 2000). Toutefois, la cytométrie en flux présente certaines limitations. Par exemple, cet outil a de la difficulté à détecter les cellules bactériennes à de très faibles concentrations (100-1000 cellules/mL). Cette limite dépend principalement de la présence d'un bruit de fond et de l'hétérogénéité de l'échantillon (Vives-Rego et al., 2000). De plus, la cytométrie en flux est limitée à l'analyse d'organismes dont la taille est inférieure à 100  $\mu\text{m}$  et n'est pas adaptée à l'étude des microorganismes associés à un biofilm (Collier et Campbell, 1999).

### 1.8.3 Mesure de la quantité de protéines

Les protéines sont des composantes présentes dans toutes les cellules vivantes et la quantification de celles-ci est employée pour estimer la biomasse des cellules dans un système (Characklis, 1990). La mesure directe des protéines est possible en utilisant la réaction cuivre/acide bicinchoninique (BCA). Lors de cette réaction, le cuivre (II) est réduit en cuivre (I) par la protéine dans des conditions alcalines. L'ion de cuivre (I) produit forme un complexe coloré soluble qui est quantifiable par des mesures d'absorbance. La concentration en protéines peut alors être déduite par courbe étalon entre une concentration de protéine connue et l'absorbance engendrée. La méthode BCA a l'avantage d'être rapide et simple à utiliser. Cependant, cette technique quantifie les protéines à l'échelle des microgrammes (200-1200 µg/mL) et ne peut être utilisée pour doser des échantillons contenant de très faibles quantités de protéines (Shrivastava et Nair, 2003). Cette méthode a le désavantage d'exhiber une certaine variation quant à la coloration du produit dépendamment du type de protéines en présence (Krieg *et al.*, 2005). De plus, certaines substances, comme une forte concentration de métaux, des composés réducteurs et des chélateurs (EDTA), peuvent avoir une interférence avec le réactif (Shrivastava et Nair, 2003).

### 1.8.4 Mesure de l'activité de déshydrogénase

La déshydrogénase est une enzyme associée au processus de respiration cellulaire et est couramment utilisée pour mesurer l'activité biologique d'un système. La mesure de l'activité de déshydrogénase peut être effectuée grâce à des méthodes utilisant des sels de tétrazolium, comme par exemple l'INT. Lors de la respiration, l'INT se fait réduire en un produit coloré (INT-F), qui peut être mesuré par absorbance et quantifié afin de déterminer l'activité de la déshydrogénase. La mesure de la déshydrogénase par l'INT a l'avantage d'être rapide et simple d'utilisation. Par contre, l'INT a le désavantage d'être susceptible à

la réduction chimique par des composés comme le sulfure (Gruden *et al.*, 2003). De plus, certains exopolymères bactériens, par exemple l'alginate de *Pseudomonas aeruginosa*, peuvent réduire l'INT même en absence de cellule vivante (Smith et McFeters, 1997). Néanmoins, l'erreur engendrée par la réduction abiotique de l'INT peut être évaluée grâce à des blancs chimiques (où les cellules ont été tuées) et soustraite des résultats expérimentaux. Cependant, dans certaines conditions, il a été observé que des bactéries apparemment actives n'ont pas réduit l'INT, ce qui pourrait engendrer une erreur non quantifiable (Smith et McFeters, 1997).

### **1.8.5 Mesure de l'activité enzymatique totale**

L'activité biologique d'un système peut être évaluée par la mesure de l'activité enzymatique totale via l'hydrolyse d'un composé nommé fluorescéine diacétate (FDA). Ce composé translucide devient, lorsque hydrolysé par une enzyme, de la fluorescéine, un composé vivement coloré qui peut être quantifié par absorbance avec un spectromètre. Le FDA a l'avantage de mesurer l'activité d'une variété d'enzymes, dont les estérases, protéases et lipases (Adam and Duncan, 2001). La capacité d'hydrolyser la FDA semble largement répandue parmi les microorganismes décomposeurs, particulièrement chez les bactéries et les mycètes (Schnürer et Rosswall, 1982). Toutefois, il a été rapporté dans la littérature que le FDA pouvait se dégrader spontanément en fluorescéine dans des solutions légèrement alcalines ( $\text{pH} \geq 8.0$ ) (Brunius, 1980) ainsi qu'en milieu acide ( $\text{pH} \leq 5.0$ ) (Schnürer et Rosswall, 1982). La présence de matière organique en solution peut aussi causer des problèmes de mesure lors de l'analyse des échantillons (Adam and Duncan, 2001). De plus, une partie de la fluorescéine peut être adsorbée par les sédiments, ce qui pourrait engendrer une perte d'environ 5% de la fluorescéine produite lors de la réaction (Schnürer et Rosswall, 1982). Dans certains sols comprenant une grande quantité d'argile

et un contenu élevé en matière organique, l'adsorption pourrait aller jusqu'à 14% (Adam and Duncan, 2001).

### **1.8.6 Mesure de la respiration aérobie**

La mesure du taux de respiration aérobie permet d'évaluer l'activité métabolique des communautés microbiennes aérobies et/ou facultatives présentes dans le système à l'étude. Pour évaluer cette respiration le respiromètre mesure la quantité d'oxygène fournie au système durant une période déterminée. Il est avantageux de faire les mesures dans un respiromètre où les microorganismes sont en solution et sous une agitation continue afin de permettre une bonne diffusion de l'oxygène (Paletski et Young, 1995). Les mesures prises par un respiromètre sont particulièrement sensibles aux variations de la température et doivent donc être faites sous conditions contrôlées (Gómez *et al.*, 2006). Il faut aussi noter que les populations microbiennes peuvent s'acclimater aux conditions du respiromètre (en saturation d'oxygène) et développer avec le temps des communautés plus aérobie. Il est donc important de mesurer la respiration microbienne sur une courte période afin de limiter cette acclimatation des microorganismes et ainsi mesurer la consommation d'oxygène de la population initiale. De plus, les mesures de respirométrie peuvent comporter certaines erreurs liées à l'oxydation des composés abiotiques ayant un fort potentiel réducteur, tel les sulfures.

### **1.9 Hypothèses et objectifs de recherche**

Cette recherche a été effectuée dans le but de mettre en évidence l'influence qu'ont les plantes sur la densité et l'activité microbienne en marais artificiel. Selon la première hypothèse (1), la présence de plantes favorise l'établissement des microorganismes dans les marais artificiels. Cette idée est souvent présumée dans la littérature, bien que peu d'études l'ont démontré en marais artificiel. Selon la seconde hypothèse (2), l'espèce de

plante, par sa morphologie particulière, a une influence spécifique sur la densité et l'activité microbienne en marais artificiel. L'effet de l'espèce de plantes sur les microorganismes reste encore spéculatif, puisque peu d'études ont abordé le sujet, et les preuves sont souvent indirectes. Finalement, selon la dernière hypothèse (3), la répartition des microorganismes se fait selon la distribution spatiale du système racinaire, car ceux-ci sont principalement localisés sur les racines et sur sable adjacent. La dispersion dans l'espace et la localisation des microorganismes en marais artificiel est un sujet d'étude novateur et très peu de recherche s'y sont attardée.

Les objectifs suivants ont été établis afin de vérifier les hypothèses de recherche :

- **Objectif 1:** Mesurer la densité et l'activité des microorganismes dans des marais artificiels plantés comparativement à des témoins non plantés.
- **Objectif 2:** Comparer la densité et l'activité des microorganismes associés à des marais artificiels plantés en monoculture de trois espèces de plantes. Mettre en relation les caractères morphologiques de chacune des espèces de plantes avec les mesures de densité et l'activité microbienne.
- **Objectif 3:** Mettre en relation la biomasse et la surface racinaire avec les mesures de densité et l'activité microbiennes selon la profondeur. Comparer la densité et l'activité microbienne localisées spécifiquement sur les racines, le sable et dans le liquide interstitiel selon la présence et l'espèce de plantes.

Afin de répondre aux objectifs, des expériences en serre ont été effectuées à l'aide de marais sous surfacique à flux horizontal. L'installation expérimentale consistait de microcosmes plantés en monoculture de *Typha angustifolia*, *Phragmites australis*, *Phalaris arundinacea* ainsi que d'un témoin non planté, le tout en six réplicats. Les 24 microcosmes ont été regroupés en 6 « blocs » comprenant chacun 4 microcosmes (les 3 espèces de plantes et le témoin non planté). À l'intérieur d'un « bloc » les 4 microcosmes

ont été placés selon un ordre aléatoire afin de minimiser l'effet de l'environnement. Les microcosmes ont été alimentés pendant 2 mois avec un effluent piscicole. À la fin de la saison, le contenu des microcosmes a été totalement récupéré selon deux profondeurs (0-10 cm et 10-20 cm). Afin de ne pas engendrer de biais par la spécificité des techniques d'analyse, plusieurs méthodes ont été utilisées pour mesurer la densité et l'activité microbienne. De plus, les caractéristiques morphologiques des plantes telles que la biomasse aérienne et souterraine, le nombre de tige ainsi que la surface racinaire ont été mesurés.

### **1.10 Organisation et contenu du mémoire**

Le chapitre 1 a présenté une introduction générale, une revue de la littérature ainsi que les hypothèses et objectifs de recherche. Le chapitre 2 constituera le corps principal du mémoire en relatant les principaux résultats de la recherche. Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article scientifique qui a été soumis à la revue *Water Sciences and Technology* pour publication. Les annexes présenteront une multitude de détails qui n'ont pas été intégrés au corps du mémoire afin de ne pas alourdir le texte. L'annexe 1 est un tableau synthèse présentant une revue de la littérature des études traitant de la densité, l'activité et la diversité microbiennes en marais artificiel. L'annexe 2 montrera l'installation expérimentale ainsi que les zones d'échantillonnages. L'annexe 3 exposera en détail les différentes méthodes d'analyse utilisées lors de cette recherche. L'annexe 4 montrera les données brutes recueillies lors des expériences. L'annexe 5 montrera les résultats statistiques.

### **1.11 Apport de l'étudiant à la maîtrise et de ses coauteurs à l'article**

L'article suivant a été écrit en totalité par l'étudiant à la maîtrise et est basé sur ses résultats d'expériences. Les coauteurs ont fourni le support intellectuel nécessaire pour la planification et l'exécution des expériences ainsi que pour la relecture de l'article.

## Chapitre 2: Influence of macrophyte species on microbial density and activity in constructed wetlands

Vincent Gagnon, Florent Chazarenc, Yves Comeau and Jacques Brisson

### 2.1 Abstract

It is often assumed that the presence of plants in constructed wetlands allows a better wastewater treatment, mainly because plant rhizospheres stimulate microbial communities. Yet, fundamental interactions between plants and associated microorganisms remain only partly understood. The aim of our project was to evaluate microbial density and activity associated with the rhizosphere of three plant species in subsurface constructed wetlands. Experimental set-up, in six replicates, consisted of four 3.6 L microcosms respectively planted in monoculture of *Typha angustifolia*, *Phragmites australis*, *Phalaris arundinacea* and unplanted control. Plants were grown for two months with  $25 \text{ L m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  of secondary effluent (in  $\text{g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ : 1.3 TSS, 7.5 COD, 1.0 TKN). Microcosms were entirely sampled according to depth (0-10, 10-20 cm). Microorganisms were extracted with 500 mL of a buffer solution. Microbial density was directly estimated by flow cytometry and indirectly by protein measurements. Biological activities were determined using respirometry assays, dehydrogenase and total enzymatic activities measurements.

Microbial density and activity were higher in the presence of plants, with significantly higher values associated with *Phalaris arundinacea*. Aerobic respiration rate were greater in planted microcosms, suggesting root oxygen release. Microbes were present on sand and roots and microbial density and activities were correlated to root surface. Plant species morphology and establishment period seem to be a key factor influencing microbial-plant interactions.

### Keywords

Constructed wetlands; microbial activity; rhizosphere; microcosm; root surface



## 2.2 Introduction

It is generally assumed that planted constructed wetlands outperform unplanted controls mainly because the plant rhizosphere stimulates microbial communities. Yet, fundamental interactions between plants and associated microorganisms remain poorly understood. It has been suggested that the plant rhizosphere enhances microbial density and activity by providing root surface for microbial growth, a source of carbon compound through root rhizodeposition and a microaerobic environment via root oxygen release (Gersberg *et al.*, 1986; Brix, 1997). Higher microbial densities in planted systems were reported in full scale constructed wetlands, with  $2.7 \times 10^6$  CFU/g of gravel evaluated by culture methods (Hatano *et al.*, 1993), and in planted microcosms with  $3.2 \times 10^9$  /g of gravel measured by fluorescence microscopy (Münch *et al.*, 2005). Microbial density can also differ according to plant species, with greater densities observed with *Phragmites australis* compared to *Phalaris arundinacea* (Vymazal *et al.*, 2001a) and *Typha angustifolia* (Hatano *et al.*, 1993). Plant species-specific morphology can influence microbial density as suggested by Kyambadde *et al.* (2004), who measured higher root surface and microbial density in constructed wetlands planted with *Cyperus papyrus* compared to *Miscanthidium violaceum*. Plant species can also differ by the amount of root rhizodeposition (Zhu and Sikora, 1995) and by root oxygen release ( $0.02$ - $12 \text{ g O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ ) (reviewed by Brix, 1997), which may in turn influence microbial communities. Several microbial parameters have been measured in constructed wetlands, including microbial components (protein, phospholipids, exopolysaccharide), enzymatic activities (protease, phosphatase, urease), and respiration (dehydrogenase) (Hatano *et al.*, 1993; Shackle *et al.*, 2000; Liang *et al.*, 2003; Larsen and Greenway, 2004; Ragusa *et al.*, 2004). However, most studies generally evaluate only one or two microbial parameters and rarely associate those findings to plant presence or species.

Our project aimed at evaluating the influence of the presence of plants and possible differential effects of plant species on microbial density and activities, in a well-replicated experiment using microcosms. Microbial spatial distribution was also assessed according to depth, distance from the rhizosphere and localisation (on root, sand and interstitial liquid). To insure minimal bias caused by the specificity of the measurement, several techniques were used to assess plant influence on microorganisms. It was observed that the presence of plants enhanced microbial density and activity with significantly higher values associated with *Phalaris arundinacea* than with *Typha angustifolia* and *Phragmites australis*. Plant species morphology and establishment period seemed to be a key factor influencing microbial-plant interaction.

### 2.3 Methods

The experiment was conducted under greenhouse conditions using microcosms (30 x 4 x 30 cm) filled with 2 mm silica sand (porosity: 0.33). Each microcosm had a rooted and an unrooted section separated with a 60  $\mu\text{m}$  membrane (Figure 2.1).

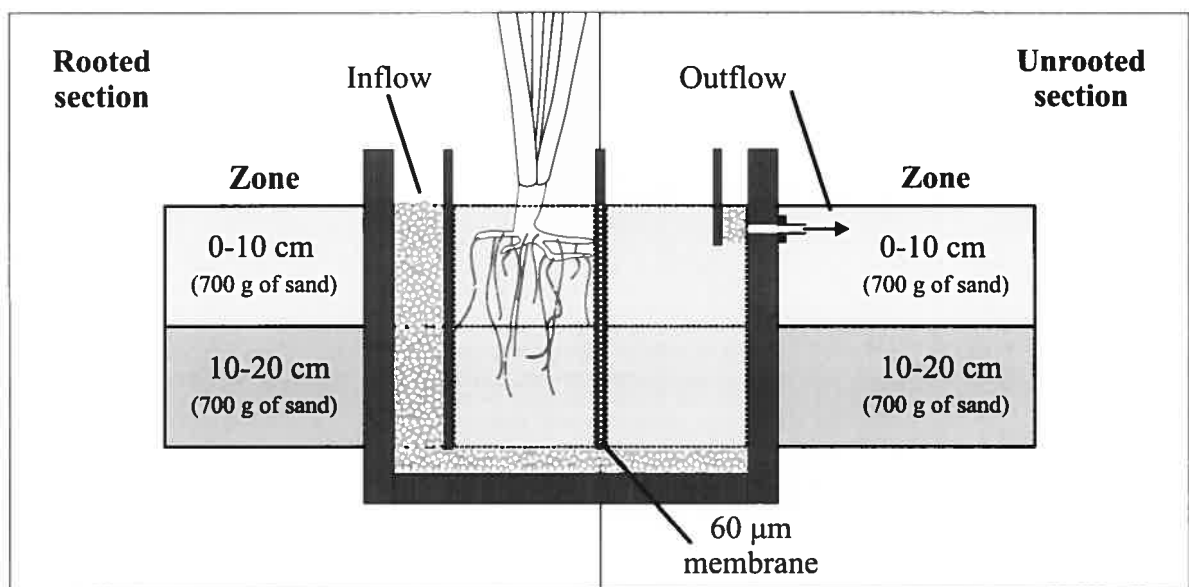


Figure 2.1: Microcosm design illustrating section and zone separation

Experimental set-up, in six replicates, consisted of four microcosms respectively planted in monoculture of *Typha angustifolia*, *Phragmites australis*, *Phalaris arundinacea* and unplanted control. *In vitro* techniques were used to produce plants of the same age under sterile conditions, using disinfected seeds for *Typha angustifolia* and nodes for *Phragmites australis* and *Phalaris arundinacea*. Each microcosm was planted with a monoculture of four plantlets and fertilised during the two first months to enable plant establishment. Microcosms were then fed during the two following months, with 25 L m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> of a reconstituted fish farm effluent (in g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>: 1.3 TSS, 7.5 COD, 1.0 TKN). At the end of the feeding period, the aboveground biomass was harvested and dried for biomass estimation. Microcosm content was then entirely removed according to four sections, as presented in Figure 2.1, for further biological analysis. First interstitial water was slowly pumped out (200 mL) according to depth (0-10 cm and 10-20 cm), then, sand and roots were collected from each depth (0-10 and 10-20 cm). Microbial communities were extracted by shaking the sand and roots in 500 mL phosphate buffer (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9.3 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 g/L) for 5 minutes. Extracted solution (500 mL) and interstitial water (200 mL) were combined and filtered (Ø: 112 µm) to eliminate rootlets. For one replicate: sand, roots and interstitial liquid were analysed separately to measure spatial pattern of microbial density and activity in the microcosms. Representative samples of fresh root were scanned and root surface of each species was estimated using WinRHIZO™ 4.1c software (Regent Instruments Inc., QC, Canada). Belowground biomass was dried and the complete root surface of each species was estimated using a surface/dry weight ratio of the root sample extrapolated to the whole root mass present in the microcosm. The influence of plant species and depth on microbial parameters was statistically analysed with SAS statistical software using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple comparisons for differences between means.

Protein contents were determined using Bicinchoninic Acid Kit Solution (BCA, Sigma<sup>®</sup>, St-Louis, MO, USA) and the method detailed by Smith *et al.* (1985). Bacteria were counted by flow cytometry (FACScan, Becton&Dickinson, San Jose, USA) on pre-fix extracted solution (1% glutaraldehyde) stored at 4°C. Pre-fix extracted solutions (50 µL) were diluted 20 times, and stained for 10 minutes with 5 µM final concentration of fluorescent dye (SYTO<sup>®</sup> 13, Molecular Probes<sup>™</sup>, Eugene, OR, USA). A known concentration of 1 µm fluorescent beads (FluoSpheres<sup>®</sup> sulphate microspheres, 1.0 µm, Molecular Probes<sup>™</sup>, Eugene, OR, USA) was added to the sample as a standard. Bacterial concentration was determined by comparing the amount of fluorescent beads to the number of bacteria counted (adapted from del Giorgio *et al.*, 1996). Potential aerobic respiration was estimated using a respirometer (AER-200, Challenge Environmental Systems Inc., Fayetteville, AR, USA) on 500 mL of extracted solution placed in a 1 L bottle under continuous agitation for 5 hours. Total enzymatic activity was measured using fluorescein diacetate (FDA, Sigma<sup>®</sup>, St-Louis, MO, USA) according to a protocol adapted from Adam and Duncan (2001): 20 µL of FDA (2 mg/mL) were added to 1 mL of extracted solution and incubated for 30 minutes at 30°C under agitation. The reaction was stopped with 0.5 mL of chloroform/methanol (2:1) and the aqueous phase was measured by absorbance (490 nm) and compared to standards. Dehydrogenase activity was measured by the reduction rate of 4-iodonitro-tetrazolium violet (INT, Molecular Probes<sup>™</sup>, Eugene, OR, USA) to INT-Formazan (INT-F). Dehydrogenase was assessed using 250 µL of INT (4 mM) and 1 mL of extracted solution, incubated during 1 hour at room temperature. The reaction was stopped with 250 µL of formaldehyde (37%) and the INT-Formazan precipitate was extracted using methanol for 30 minutes. Supernatant absorbance (480 nm) was measured and INT-F concentration was calculated using Beer-Lambert's law.

## 2.4 Results and discussion

### 2.4.1 Influence of plant presence on microbial density and activity

The presence of plants significantly enhanced microbial density and activity in the microcosms. The mean of each microbial measurement (Table 2.1) was statistically different between planted and unplanted microcosms (Student's t test,  $P < 0.05$ ). Results showed a bacterial density ratio of 10 between planted and unplanted microcosms. This is in the same range (7 to 13) found in other studies conducted in experimental microcosms (Münch *et al.*, 2005) and in full-scale constructed wetlands (Hatano *et al.*, 1993).

Table 2.1: Total microbial density and activity in planted (mean of all species) and unplanted microcosms.

	Bacterial density	Protein content	Dehydrogenase activity	Total enzymatic activity	Aerobic respiration rate
	$10^{10}$ bacteria microcosm <sup>-1</sup>	mg protein microcosm <sup>-1</sup>	$10^{-5}$ mol INT-F. hr <sup>-1</sup> microcosm <sup>-1</sup>	mg fluo. hr <sup>-1</sup> microcosm <sup>-1</sup>	mg O <sub>2</sub> . hr <sup>-1</sup> microcosm <sup>-1</sup>
Planted	20	30	3	156	9
Unplanted	2	11	1	60	2
Ratio	10.3	2.8	3.5	2.6	4.1

Higher aerobic respiration rate was measured in planted microcosms (Table 2.1), supporting the assumed role of plants in generating microaerobic environment in the rhizosphere (Brix, 1994, 1997; Wießner *et al.*, 2002a). Greater microbial densities and activities in planted microcosms can also be explained by high carbon availability in the rhizosphere resulting from root rhizodeposition (Andrews and Harris, 2000; Karjalainen *et al.*, 2001). Total enzymatic activities were higher when plants were present (Figure 2.2), indicating enhanced microbial activity. However, the direct release of enzymes by plant may also have contributed, since roots can exude a variety of compounds, including small quantities of enzymes (e.g. amylase, phenolase, phosphatase, protease) (reviewed in Uren, 2001). Further investigations must be made to evaluate the possible production of enzymes by macrophytes and their interaction with pollutants. It has also been suggested that plants enhanced microbial density by providing surface for microbial growth (Gersberg *et al.*,

1986; Brix, 1994, 1997; Kyambadde *et al.*, 2004). Within planted microcosms (all species confounded), root surface was correlated to bacterial density ( $r = 0.91$ ,  $P < 0.001$ ), microbial aerobic respiration ( $r = 0.78$ ,  $P < 0.001$ ), dehydrogenase activity ( $r = 0.65$ ,  $P < 0.01$ ), protein content ( $r = 0.58$ ,  $P < 0.05$ ) and total enzymatic activities ( $r = 0.57$ ,  $P < 0.05$ ). In all cases, microbial density and activity was poorly correlated to root biomass ( $r = 0.02 - 0.13$ ,  $P = 0.31 - 0.48$ ). However, it must be noted that for the same root biomass, a large root surface usually indicated a high proportion of fine roots and rootlets. Thus, the correlation between root surface and microorganisms may indirectly be related to root rhizodeposition and oxygen release since it has been shown that those compounds come principally from young roots and rootlets (Armstrong and Armstrong, 1988; Andrews and Harris, 2000).

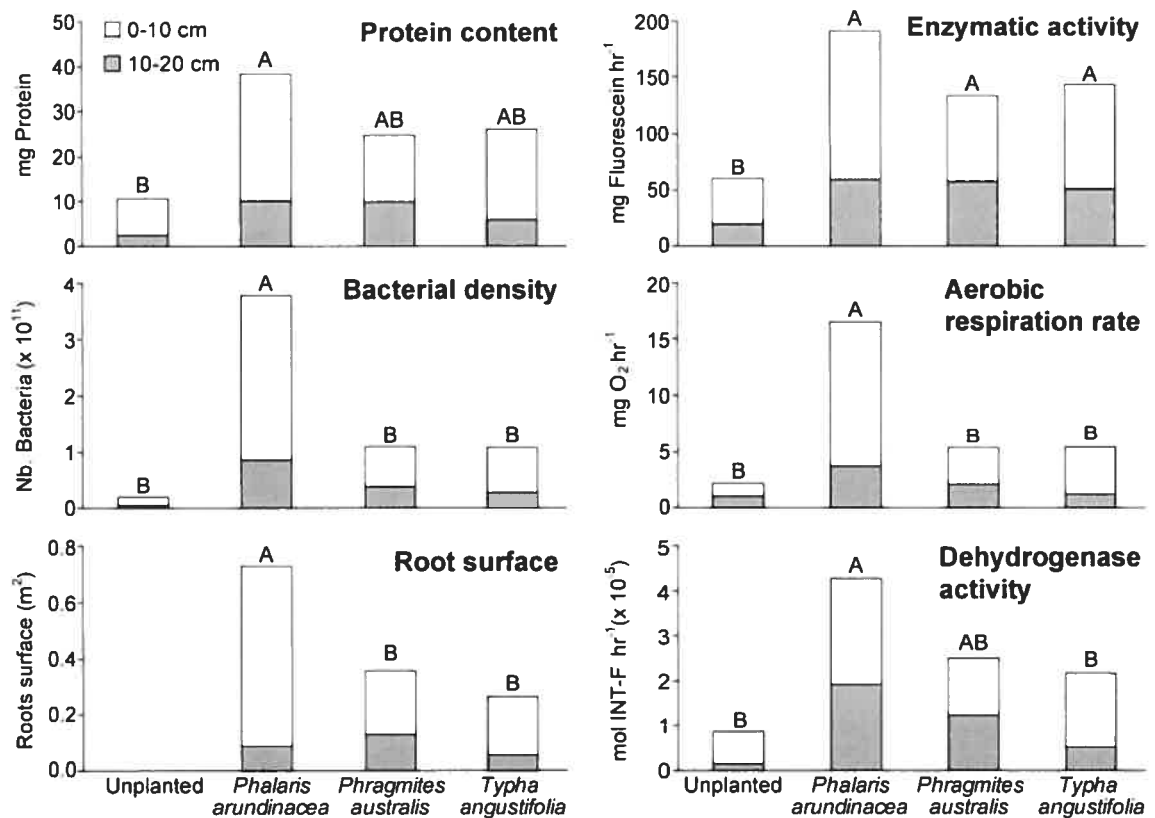


Figure 2.2: Microbial densities, activities and root surface per microcosm depending on depth (0-10 cm 10-20 cm) (A,B significant value  $P < 0.05$ ). (Mass of sand per depth zone: 700 g)

### 2.4.2 Influence of plants species on microbial density and activity

When compared to the unplanted control, microcosms containing plant species always had higher microbial density and activity, although the differences between unplanted and *Phragmites* or *Typha* were not always statistically significant (Figure 2.2). There were also differences between plant species, with significantly higher values associated with *Phalaris* compared to *Typha* and *Phragmites*, at least for some measures of microbial activity (Figure 2.2). A plant species' particular root and shoot morphology may be a key factor influencing microbial density and activity. It has been shown that the oxygen release rate of plants is strongly correlated to aboveground biomass (Wießner *et al.*, 2002b). In the present study, *Phalaris* had the highest aboveground biomass ( $r = 0.93$ ,  $P < 0.001$ ), the highest number of stems per microcosm ( $r = 0.96$ ,  $P < 0.001$ ) (Table 2.2) and the largest root surface ( $r = 0.91$ ,  $P < 0.01$ ) (Figure 2.2).

Table 2.2: Plant species biomass and shoot numbers for the first growth season (Mean  $\pm$  St. dev.,  $n = 6$ ; a,b significant value  $P < 0.05$ )

	Belowground biomass	Aboveground biomass	Shoot number
	g	g	
<i>Phalaris arundinacea</i>	11 $\pm$ 3 (a)	57 $\pm$ 8 (a)	88 $\pm$ 24 (a)
<i>Phragmites australis</i>	6 $\pm$ 2 (b)	24 $\pm$ 11 (b)	32 $\pm$ 5 (b)
<i>Typha angustifolia</i>	20 $\pm$ 5 (b)	17 $\pm$ 5 (b)	6 $\pm$ 2 (b)

The difference in microbial aerobic respiration rates (16 mg O<sub>2</sub> hr<sup>-1</sup> microcosm<sup>-1</sup> with *Phalaris* compared to approximately 5 for *Phragmites* and *Typha*) can also be due to the plant species differences in root oxygen release, as reported by Brix (1997). Higher microbial density and activity associated with *Phalaris* may have been caused by its rapid colonisation strategy, going from 4 to 88 stems on average per microcosm during the first growth season (Table 2.2). In comparison, *Phragmites* and *Typha* did not reach maximum biomass during the same period. In another study, *Phalaris* was shown to reach its maximum biomass faster than *Phragmites* (1-2 years compared to 3-4 years, respectively)

(Vymazal and Krópfelová, 2005). These facts may explain why we observed higher microbial density associated with *Phalaris* than with *Phragmites* in contrast with the findings of Vymazal *et al.* (2001a). Plant-microbe interactions will certainly change with time depending on a plant species' establishment period and other parameters such as organic matter accumulation, plant litter characteristics (Chazarenc and Merlin, 2005) and season's variation (Jenssen *et al.*, 1993; Stein *et al.*, 2005).

#### **2.4.3 Plant species' influence on microbial spatial distribution**

Root spatial dispersion differs between plant species, resulting in specific microbial distribution. *Phalaris* and *Typha* had significantly ( $P < 0.05$ ) higher root surface in the upper zone of the microcosm (0-10 cm) along with greater microbial density and activity in this region ( $P < 0.01$ ) (Figure 2.2). In contrast, *Phragmites* root surface was similar throughout depths (0-20 cm), as were microbial density and activity. The unplanted control also had significantly higher density and activity in the upper zone of the microcosm (0-10 cm), except for aerobic respiration rate, which was equally low at both depths. Higher values measured in the first 10 cm of the unplanted control were most probably linked to algal proliferation near the surface (green color development) since unplanted microcosms were not shaded by plants. Since root dispersion influences microbial spatial distribution in constructed wetlands, well-dispersed roots should be favoured to maximize the rhizosphere effect.

Results have shown that the unrooted section of the microcosm (Figure 2.1) was not statistically different from the unplanted control (Annexe 4 Figure A4.1-2-3). Therefore, the rhizosphere did not exhibit a long distance effect on microbial density and activity. Experiments made by Münch *et al.* (2005), have shown that roots had a positive influence on microorganisms up to 30-50 mm away from the root surface. Since the rhizosphere



effect seems limited to a short distance from the root zone, densely planted systems with high root coverage should be favoured in constructed wetlands.

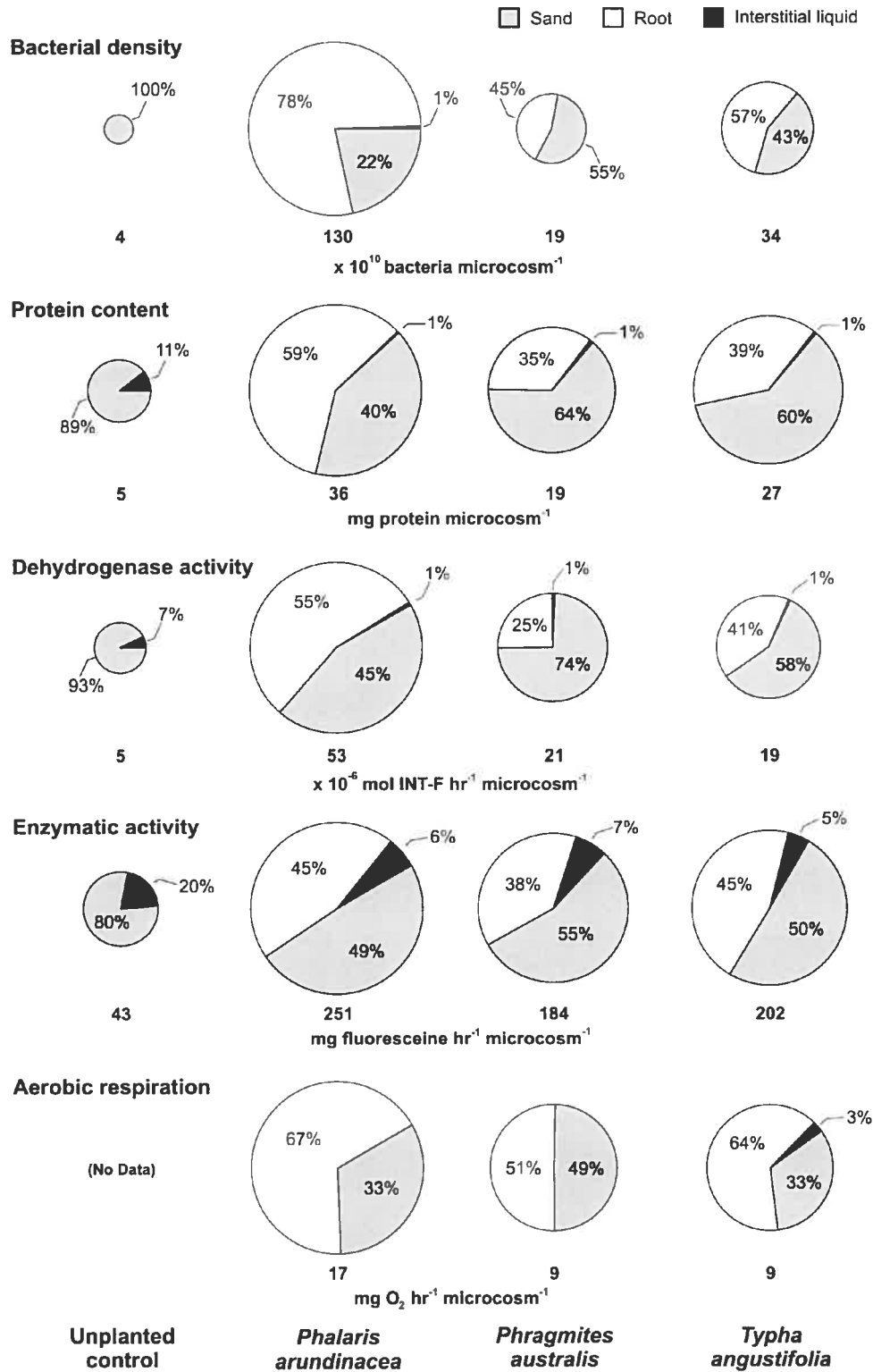


Figure 2.3: Localisation of microbial density and activity per microcosm (n = 1)

Microbial density and activity, for the three macrophyte species, were mainly located on the sand and roots with very low values associated with the interstitial liquid, thus indicating the presence of attached microorganisms (Figure 2.3). However, a small enzymatic activity was detected in the interstitial liquid, revealing the presence of extracellular enzymes released by the attached microorganisms and possibly by root exudates. Extracellular enzymes are known to participate in wastewater biodegradation by hydrolysing larger fractions of organic matter into smaller compounds usable by the microbial communities (Gessesse *et al.*, 2003). Therefore, even though interstitial liquid had low microbial density and activity, the presence of free enzymes could contribute to overall biodegradation of pollutants.

Microbial fraction located on the sand was always greater in the presence of plants, confirming the positive influence of roots on their immediate surrounding. When compared to the other species, *Phalaris* had a larger fraction of microbial density and activity associated with their roots, which could be due to the higher root surface of the species. Microbial measurements for *Phragmites* and *Typha* were similar, yet the fraction located on the sand and roots were different, with higher values on the roots of *Typha*. This may also be explained by the greater root surface of *Typha* ( $0.390 \text{ m}^2$ ) compared to *Phragmites* ( $0.317 \text{ m}^2$ ) in those particular microcosms. Since macrophyte roots seem to play an important role in supporting microorganisms, particular attention should be paid to adequate plant selection, particularly when novel species are used. It must be noted, however, that only one microcosm per treatment was measured (no replicates). Therefore, comparisons among results must be interpreted with caution as we can not estimate the inherent variability of the measurements.

## 2.5 Conclusion

Results strongly support the role of plants in constructed wetlands mainly through the beneficial effect of the rhizosphere on microbial density and activity. The use of several microbiological techniques in this study has shown that plant influence was not specific to a particular activity but had a global effect on microorganisms. Greater aerobic respiration rate were measured in planted microcosms, suggesting the influence of root oxygen release. Some differences were found between plant species, with significantly higher values associated with *Phalaris*. Underground plant morphology seemed to play a key role, since microbial density and activity were always positively correlated to root surface. In addition, microorganisms were mainly located on the sand and roots. As a result, plant species used in constructed wetlands should ideally have a high root surface, good root dispersion throughout depths, and exhibit a rapid colonisation of the wetlands.

Experiments have shown that plant species had a differential influence on microorganisms during the first growth season; further investigations should examine microbial-plant interactions in older constructed wetlands. Furthermore, seasonal variation in pollution removal could be explored through the measurement of microbial parameters, with particular attention to plant influence at low temperatures. Microbial communities responsible for pollutant biodegradation should also be examined by assessing the microbial diversity in the rhizosphere of different plant species and comparing those values to pollution removal.

## 2.6 Acknowledgements

The authors would like to thank Stéphane Daigle, Jean-François Dallaire, Denis Lauzer, Laurene Michelle, David Morse, Carole Radix and Caroline Ruh for their help.

### Chapitre 3: Conclusion générale

Cette recherche a permis de mettre en évidence l'importance qu'ont les plantes en marais artificiel, particulièrement en ce qui concerne leurs influences sur la densité et l'activité microbienne.

Suivant le premier objectif, soit l'effet de la présence de plantes, nos résultats confirment que les plantes ont une influence positive sur les microorganismes. En effet, une densité et une activité microbienne plus élevées ont été mesurées dans les microcosmes plantés comparativement aux témoins non plantés. De plus, la densité microbienne et le taux de respiration aérobie étaient plus importants en microcosmes plantés, suggérant ainsi l'importance de la libération d'oxygène par le système racinaire. De plus, il y a une corrélation positive entre la surface racinaire et la densité ainsi que l'activité microbiologique. En outre, les résultats obtenus semblent confirmer l'hypothèse voulant que la surface des racines soit un lieu propice pour l'établissement et la croissance des microorganismes dans les marais artificiels.

Suivant le second objectif, soit l'effet de l'espèce de plante, les résultats indiquent que les microcosmes plantés en *Phalaris arundinacea* avaient généralement une densité et une activité microbienne statistiquement plus élevées que ceux plantés en *Phragmites australis* et *Typha angustifolia*. Cette différence entre les espèces de plante pourrait être causée par leurs morphologies particulières. Comparativement aux autres espèces, les microcosmes plantés en *Phalaris arundinacea* avaient une plus grande surface racinaire, un nombre de tiges plus élevé ainsi qu'une plus grande biomasse aérienne. De plus, la colonisation du microcosme par *Phalaris arundinacea* s'est effectuée plus rapidement, tandis que *Phragmites australis* et *Typha angustifolia* n'ont pu atteindre leur maximum de biomasse durant la première saison de croissance. Tous ces facteurs ont certainement aidé à accentuer l'effet positif de *Phalaris* sur les microorganismes lors de cette expérience.

Toutefois, la colonisation rapide de *Phalaris*, durant la première saison, peut avoir surpeuplé les petits microcosmes et engendré un biais dans les mesures microbiologiques, ce qui limiterait l'extrapolation des résultats à un système de taille réelle.

Enfin, suivant le troisième objectif, soit la localisation des microorganismes, cette recherche a démontré que la distribution des microorganismes selon la profondeur suivait la dispersion de la surface racinaire de chacune des espèces de plantes. Puisque la dispersion des racines influence la distribution des microorganismes, il serait donc favorable d'utiliser des espèces dont les racines colonisent le marais artificiel sur toute sa profondeur. Il est à noter toutefois que même si *Phalaris* a une influence plus importante sur les microorganismes, son système racinaire est généralement peu profond ce qui pourrait avoir un impact sur l'épuration des eaux. Il a été démontré que les microorganismes étaient majoritairement localisés sur le sable et sur les racines, mais très peu dans le liquide interstitiel. Toutefois, une faible activité enzymatique a été détectée dans le liquide interstitiel, suggérant la présence d'enzymes extracellulaires qui pourraient contribuer à la biodégradation des polluants. La densité et l'activité des microorganismes présents sur le sable étaient toujours plus élevées en présence de plantes, montrant ainsi l'influence qu'ont les racines sur leur environnement. Cet effet de la rhizosphère semble toutefois être à courte distance, puisque la section du microcosme dépourvue de racine n'était pas statistiquement différente des témoins non plantés en terme de densité et d'activité microbienne. De ce fait, il serait donc préférable d'éviter de larges sections non plantées ou des zones dépourvues de racines en marais artificiels.

Puisque l'interaction entre les plantes et les microorganismes en marais artificiel est un sujet d'études relativement récent, plusieurs aspects fondamentaux restent encore à être étudiés. Par exemple, il serait intéressant de mesurer l'influence de la densité, l'activité et la diversité microbienne associées aux différentes espèces de plantes sur l'enlèvement des

divers type de pollution en marais artificiel. De plus, l'effet de la saison sur l'évolution des paramètres microbiologiques et son influence sur le niveau d'épuration restent encore inconnus.

## Références

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, R., Roberts, K., Watson, D.J. (2001) *Molecular Biology of the Cell*, 3rd edn. New York: Garland Science Publishing.
- Adam, G. and Duncan, H. (2001) Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry* 33(7-8), 943-951
- Ahn, C., Gillevet, P.M., Sikaroodi, M. (2006) Molecular characterization of microbial communities in treatment microcosm wetlands as influenced by macrophytes and phosphorus loading. *Ecological Indicators*, In press
- Allison, S.D., Vitousek, M.V. (2005) Responses of extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs, *Soil Biology and Biochemistry* 37(5), 937-944
- Andrews, J.H. and Harris, R.F. (2000) The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annual Review of Phytopathology* 38, 145-80.
- Arias, C.A., Brix, H., Marti, E. (2005) Recycling of Treated Effluents Enhances Removal of Total Nitrogen in Vertical Flow Constructed Wetlands, *Journal of environmental science and health Part A - Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 40(6-7), 1431-1443
- Armstrong, W. (1964) Oxygen diffusion from the roots of some British bog plants. *Nature* 204(4960), 801-802
- Armstrong, W. (1979) Aeration in higher plants. In: Woolhouse H. W. (Ed.), *Advances in Botanical Research*, Academic Press, London, Vol 7, pp. 225-332
- Armstrong, J., Armstrong, W. (1988) *Phragmites australis*: a preliminary study of soil-oxidising sites and internal gas transport pathways. *New Phytologist* 108(4), 373-382
- Atlas, R.M., Bartha, R. (1997) *Microbial ecology: fundamentals and applications*, 4th ed., Benjamin/Cummings Publishing Company, USA, pp. 694
- Baptista, J.D.C., Donnelly, T., Rayne, D., Davenport, R.J. (2003) Microbial mechanisms of carbon removal in subsurface flow wetlands. *Water Science and Technology* 48, 127-134
- Barko, J.W., Smart, R.M. (1983) Effects of organic matter additions to sediment on the growth of aquatic plants. *Journal of Ecology* 71: 161-175
- Bezbaruah, A.N., Zhang, T.C. (2004) pH, Redox, and Oxygen Microprofiles in Rhizosphere of Bulrush (*Scirpus validus*) in a Constructed Wetland Treating Municipal Wastewater. *Biotechnology and Bioengineering* 88(1), 60-70

- Belnap, J., Hawkes, C. V., Firestone, M. K. (2003) Boundaries in Miniature: Two Examples from Soil, *BioScience* 53(8), 739-749
- Brix, H. (1987) Treatment of wastewater in the rhizosphere of wetland plants – the Root-Zone Method. *Water Science and Technology* 19(1-2), 107-118
- Brix, H. (1993) Wastewater treatment in constructed wetlands: system design, removal processes and treatment performance. In: Moshiri, G.A. (Ed.), *Constructed Wetlands for Water Quality Improvement*, Lewis Publishers, USA, pp. 4-9
- Brix, H. (1994) Functions of macrophytes in constructed wetlands. *Water Science and Technology*, 29(4), 71-78.
- Brix, H., (1997) Do macrophytes play a role in constructed treatment wetlands? *Water Science and Technology* 35(5), 11-17
- Brunius, G. (1980) Technical aspects of 3',6'-diacetyl fluorescein for vital fluorescent staining of bacteria. *Current Biology* 4, 321–323.
- Carpenter, S., R. (1996) Microcosm experiments have limited relevance for community and ecosystem ecology. *Ecology* 77, 677-680
- Characklis, W.G. (1990) Laboratory biofilm reactors. In Characklis W.G. and Marshall K.C. (Ed.), *Biofilms*, John Wiley & Sons Inc. New York, pp 55-89
- Chazarenc, F. and Merlin, G. (2005) Influence of surface layer on hydrology and biology of gravel bed vertical flow constructed wetlands. *Water Science and Technology* 51(9), 91-97.
- Criado, C., Bécáres, E. (2005) Characterization of bacterial communities of a constructed wetland in cold conditions. *Journal of General Apply Microbiology* 51, 197-201
- Cronk, J.K., Fennessy, M.S. (2001) *Wetland Plants: Biology and Ecology*, Lewis Publishers, New York pp 462
- Collier, J., L., Campbell, L. (1999) Flow cytometry in molecular aquatic ecology. *Hydrobiologia* 361(1-3), 53-65
- Collins, B.S., McArthur, J.V, Sharitz, R.R. (2004) Plant effects on microbial assemblages and remediation of acidic coal pile runoff in mesocosm treatment wetlands. *Ecological Engineering* 23, 107-115
- Coleman, J., Hench, K., Garbutt, K., Sexstone, A., Bissonnette, G., Skousen, J. (2000) Treatment of domestic wastewater by three plant species in constructed wetlands. *Water, Air and Soil Pollution* 128 (3-4), 283-295
- del Giorgio, P.A., Bird, D.F., Prairie, Y.T. and Planas, D. (1996) Flow cytometric determination of bacterial abundance in lake plankton with the green nucleic acid stain SYTO 13. *Limnology and Oceanography* 41(4), 783-789.



- Edwards, K. R., Čížková, H., Zemanová, K., Šantrůčková, H. (2006) Plant growth and microbial processes in a constructed wetland planted with *Phalaris arundinacea*. *Ecological Engineering* 27(2), 153-165
- Eller, G., Krüger, M., Frenzel, P. (2005) Comparing field and microcosm experiments: a case study on methano- and methylo-trophic bacteria in paddy soil. *FEMS Microbiology Ecology* 51(2), 279-291
- Farahbakhshazad, N., Morrison, G. M. (1997) Ammonia removal processes for urine in an upflow macrophyte system. *Environmental Science and Technology* 31(11), 3314-3317
- Faulkner, S. (2004) Soils and Sediment: Understanding Wetland Biogeochemistry. In: Spray, S.L., and McGlothlin, K.L. (Ed.), *Wetlands: Exploring Environmental Challenges, A Multidisciplinary Approach*, Rowman & Littlefield Publishers, Toronto, pp. 34-50
- Flemer, D.,A., Ruth, B.,F., Bundrick, C.,M., Moore, J.,C., (1997) Laboratory Effects of Microcosm Size and the Pesticide Chlorpyrifos on Benthic Macroinvertebrate Colonization of Soft Estuarine Sediments. *Marine Environmental Research* 43(4), 243-263
- Fontenot, Q., Bonvillain, C., Kilgen, M., Boopathy, R. (2007) Effects of temperature, salinity, and carbon: nitrogen ratio on sequencing batch reactor treating shrimp aquaculture wastewater. *Bioresource Technology* 98(9), 1700-1703
- Fraser, L.H., Carty, S.M., Steer, D. (2004) A test of four plant species to reduce total nitrogen and total phosphorus from soil leachate in subsurface wetland microcosms. *Bioresource Technology* 94(2), 185-192
- Gersberg, R.M., Elkins, B.V., Goldman, C.R. (1985) Wastewater treatment by artificial wetlands. *Water Science and Technology* 17, 443-450.
- Gersberg, R.M., Elkins, B.V., Lyon, S.R. and Goldman, C.R. (1986) Role of aquatic plants in wastewater treatment by artificial wetlands. *Water Research* 20(3), 363-368.
- Gessesse, A., Dueholm, T., Petersen, S.B., Nielsen, P.H. (2003) Lipase and protease extraction from activated sludge, *Water Research* 37(15), 3652-3657.
- Gianfreda, L., RAO, M.A. (2004) Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 35, 339-354
- Gómez, R., B., Lima, F., V. (2006) The use of respiration indices in the composting process: a review. *Waste Management and Research* 24, 37-47
- Gruden C., L., Fevig, S., Abu-Dalo, M., Hernandez, M. (2003) 5-Cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) reduction in a mesophilic anaerobic digester: Measuring redox behavior, differentiating abiotic reduction, and comparing FISH response as an activity indicator. *Journal of Microbiological Methods* 52, 59-68

- Hatano, K., Trettin, C.C., House, C.H., Wollum, A.G. II (1993) Microbial populations and decomposition activity in three subsurface flow constructed wetlands. In: Moshiri, G.A. (Ed.), *Constructed Wetlands for Water Quality Improvement*, Lewis Publishers, USA, pp 541-547
- Hatano, K., Frederick, D.J., Moore, J.A. (1994) Microbial ecology of constructed wetlands used for treating pulp mill wastewater. *Water Science and Technology* 29(4), 233-239
- Hill, K., E., Top, E., M. (1998) Gene transfer in soil systems using microcosms. *FEMS Microbiology Ecology* 25(4), 319-329
- Ibekwe A.M., Grieve, C.M., Lyon, S.R. (2003) Characterization of Microbial Communities and Composition in Constructed Dairy Wetland Wastewater Effluent. *Applied and Environmental Microbiology* 69(9), 5060-5069
- Jenssen, P.D., Mæhlum, T., Krogstad, T. (1993) Potential use of constructed wetlands for wastewater treatment in northern environments. *Water Science and Technology* 28(10), 149-157
- Kadlec, R.H., Knight, R.L. (1996) *Treatment Wetlands*. Lewis Publishers, USA, pp 893
- Kadlec, R.,H., Knight, R.L., Vymazal J. (2000) *Constructed Wetlands for Pollution Control : Processes, Performance, Design and Operation*. Scientific and Technical Report n°8. IWA Publishing, London, pp 156
- Karjalainen, H., Stefansdottir, G., Tuominen, L. and Kairesalo, T. (2001) Do submersed plants enhance microbial activity in sediment? *Aquatic Botany* 69(1), 1-13
- Kickuth, R. (1977) Degradation and incorporation of nutrients from rural wastewater by plant rhizosphere under limnetic conditions. In: *Utilization of manure by land spreading*, Commission of the European Communities EUR 5672e, London, UK, pp 335-343
- Kowalchuk, G.A., Buma, D.S., De Boer, W., Klinkhamer, P.G.L., Van Veen, J.A. (2002) Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81(1-4), 509-520
- Krieg, R., C., Dong, Y., Schwambor, K., Knuechel, R. (2005) Protein quantification and its tolerance for different interfering reagents using the BCA-method with regard to 2D SDS PAGE. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 65, 13-19
- Kuusemets, V, Lõhmus, K. (2005). Nitrogen and phosphorus accumulation and biomass production by *Scirpus sylvaticus* and *Phragmites australis* in a horizontal subsurface flow constructed wetland. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 40(6-7), 1167-1175

- Kyambadde, J., Kansiime, F., Gumaelius, L. and Dalhammar, G. (2004) A comparative study of *Cyperus papyrus* and *Miscanthidium violaceum*-based constructed wetlands for wastewater treatment in a tropical climate. *Water Research* 38(2), 475-485.
- Larsen, E. and Greenway, M. (2004) Quantification of biofilms in sub-surface flow wetland and their role in nutrient removal. *Water Science and Technology* 49(11-12), 115-122.
- Liang, W., Wu, Z., Cheng, S., Zhou, Q., Hua, H. (2003) Roles of substrate microorganisms and urease activities in wastewater purification in a constructed wetland system *Ecological Engineering* 21(2-3), 191-195
- Lloyd, J.R., Klessa, D.A., Parry, D.L., Buck, P., Brown, N.L. (2004) Stimulation of microbial sulphate reduction in a constructed wetland: microbiological and geochemical analysis. *Water Research* 38, 1822-1830
- Lynch, J.M., Whipps, J.M. (1990) Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil* 129(1), 1-10
- Marschner, P., Yang, C.H., Lieberei, R., Crowley, D.E. (2001) Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 33(11), 1437-1445
- Marschner, P., Neumann, G., Kania, A., Weiskopf, L., Lieberei, R. (2002) Spatial and temporal dynamics of the microbial community structure in the rhizosphere of cluster roots of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant and Soil* 246(2), 167-174.
- Metcalf, A., Eddy, M. S. (1991) *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal and Reuse*, 3rd eds, revised by Tchobanoglous G. and Burton F.L., New York, pp. 1334
- Moormann, H, Kusch, P, Stottmeister, U. (2002) The effect of rhizodeposition from helophytes on bacterial degradation of phenolic compounds. *Acta Biotechnologica* 22(1-2), 107-112
- Morel, F. M. M., Hering, J. G. (1993) *Principles and applications of aquatic chemistry*. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 588
- Mulder, A., van de Graaf, A .A., Robertson, L .A., Kuenen J.G. (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology* 16(3), 177-184
- Münch, Ch., Kusch, P., Röske I. (2005) Root stimulated nitrogen removal: only a local effect or important for water treatment? *Water Science and Technology* 51(9), 185-192
- Nelson, E.B. (1990) Exudate molecules initiating fungal responses to seeds and roots. *Plant and Soil* 129(1), 61-73

- Nguyen, L.M. (2000) Organic matter composition, microbial biomass and microbial activity in gravel-bed constructed wetlands treating farm dairy wastewaters. *Ecological Engineering* 16, 199-221
- Osem, Y., Chen, Y., Levinson, D., Hadar, Y. (2007) The effects of plant roots on microbial community structure in aerated wastewater-treatment reactors. *Ecological Engineering* 29, 133-142
- Ottová, V., Balcarová, J., Vymazal, J. (1997) Microbial characteristics of constructed wetlands. *Water Science and Technology* 35(5), 117-123
- Paletski, W.T., Young, J.C. (1995) Stability measurement of biosolids compost by aerobic respirometry. *Compost Science and Utilization* 3, 16-24
- Picard, C.R., Fraser, L.H., Steer, D. (2005) The interacting effects of temperature and plant community type on nutrient removal in wetland microcosms, *Bioresource Technology* 96(9), 1039-1047
- Pollard, P., Flood, J.A., Ashbolt, N.J. (1995) The direct measurement of bacterial growth in biofilms of emergent plants (*schoenoplectus*) of an artificial wetland. *Water Science and Technology* 32(8), 251-256
- Polprasert, C., Sawaitayothin V. (2006) Nitrogen mass balance and microbial analysis of constructed wetlands treating municipal landfill leachate. *Water Science and Technology* 54(11-12), 147-154
- Ragusa, S.R., McNevin, D., Qasem, S. and Mitchell, C. (2004) Indicators of biofilm development and activity in constructed wetlands microcosms. *Water Research* 38(12), 2865-2873.
- Randall, C.W., Barnard, J.L., Stensel, H.D. (1992) *Design and Retrofit of Wastewater Treatment Plants for Biological Nutrient Removal*. Technomic Publishing Co. Inc, USA
- Reddy, K.R., D'Angelo, E.M., DeBusk, T.A. (1989) Oxygen transport through aquatic macrophytes: The role in wastewater treatment. *Journal of Environmental Quality* 19(2), 261-267
- Reedy, K.R., D'Angelo, E.M. (1997) Biogeochemical Indicators to Evaluate Pollutant Removal Efficiency in Constructed Wetlands. *Water Science and Technology* 35, 1-10
- Rengel, Z., (2002) Genetic control of root exudation. *Plant and Soil* 245(1), 59-70.
- Rovira, A.D. (1959) Root excretions in relation to the rhizosphere effect. IV. Influence of plant species, age of plant, light, temperature, and calcium nutrition on exudation. *Plant and Soil* 11(1), 53-64.
- Scholz, M., Xu, J., Dodson, H. (2001) Comparison of filter media, plant communities and microbiology within constructed wetlands treating wastewater containing heavy metals. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 76(8), 827-835

- Schindler D., W. (1998) Replication versus realism: the need for ecosystem-scale experiments. *Ecosystem* 1, 323–334
- Schnürer, J., Rosswall, T., (1982) Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Applied and Environmental Microbiology* 43, 1256-1261.
- Seidel, K. (1976) Macrophytes and water purification. In: Tourbier, J. and Peirson, R.W. (Ed.), *Biological Control of Water Pollution*, chapter 14, Philadelphia, PA, USA: University of Pennsylvania Press, pp 109-120
- Shackle, V.J., Freeman, C. and Reynolds, B. (2000) Carbon supply and the regulation of enzyme activity in constructed wetlands. *Soil Biology and Biochemistry* 32(13), 1935-1940
- Shrivastava, H., Y., Nair, B., U. (2003) A fluorescence-based assay for nanogram quantification of proteins using a protein binding ligand. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 375, 169-174
- Shutes, R.B.E., Ellis, J.B., Revitt, D.M. Zhang T.T. (1993). The use of *Typhalatifolia* for heavy metal pollution control in urban wetlands, dans MOSHIRI, G.A.(1993). *Constructed Wetlands for Water Quality Improvement*, Boca Raton (Florida), Lewis Publishers, Inc., pp 407-414
- Silvan, N., Vasander, H., Karsisto, M., Laine, J. (2003) Microbial immobilisation of added nitrogen and phosphorus in constructed wetland buffer. *Applied Soil Ecology* 24, 143-149
- Silyn-Roberts, G., Lewis, G. (2003) Substrata effects on bacterial biofilm development in a subsurface flow dairy waste treatment wetland. *Water Science and Technology* 48(8), 261-269
- Silyn-Roberts, G., Lewis, G. (2001) *In situ* analysis of nitrosomonas spp. in wastewater treatment wetland biofilms. *Water Research* 35(11), 2731-2739
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goetze, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Analytical Biochemistry* 150(1), 76-85.
- Smith, J., J., McFeters, G., A. (1997) Mechanisms of INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride), and CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Microbiological Methods* 29, 161-175
- Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S., Roskot, N., Heuer, H., Berg, G. (2001) Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and Environmental Microbiology* 67(10), 4742-4751

- Sommarugal, R., Conde, D. (1997) Seasonal variability of metabolically active bacterioplankton in the euphotic zone of a hypertrophic lake. *Aquatic Microbial Ecology* 13(3) 241-248
- Spieles, D. J., Mitsch, W.J. (1999) The effects of season and hydrologic and chemical loading on nitrate retention in constructed wetlands: a comparison of low- and high-nutrient riverine systems, *Ecological Engineering* 14(1-2), 77-91
- Stein, O., Hook, P.B. (2005) Temperature, Plants, and Oxygen: How Does Season Affect Constructed Wetland Performance? *Journal of Environmental Science and Health* 40(6-7), 1331-1342
- Stottmeister, U., Wießner, A., Kusch, P., Kappelmeyer, U., Kästner, M., Bederski, O., Müller, R.A., Moormann, H. (2003) Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnology Advances* 22(1-2), 93-117
- Strous, M., Fuerst, J.A., Kramer, E.H.M., Logemann, S., Muyzer, G., Van De Pas-Scoonen, K.T., Webb, R., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M. (1999) Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* 400(6743), 446-449
- Thullen, J. S., Sartoris, J. J., Walton, W. E. (2002) Effects of vegetation management in constructed wetland treatment cells on water quality and mosquito production. *Ecological Engineering* 18(4), 441-457
- Truu, J., Nurk, K., Juhanson, J., Mander, U. (2005) Variation of microbiological parameters within planted soil filter for domestic wastewater treatment. *Journal of Environmental Science and Health* 40, 1191-1200
- Uren N.C. (2001). Types, amount and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. In: *The Rhizosphere* R. Pinton, Z. Varanini, P. Nannipieri (ed.), Marcel Dekker. Inc. New York, Basel, pp 19-40.
- Vacca, G., Wand, H., Nikolausz, M., Kusch, P., Kästner, M. (2005) Effect of plants and filter materials on bacteria removal in pilot-scale constructed wetlands, *Water Research* 39(7), 1361-1373
- Veal, D., A., Deere, Ferrari, D., B., Piper, J., Attfield, P.,V. (2000) Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *Journal of Immunological Methods* 243, 191-210
- Vincent, G, Dallaire, S, Lauzer, D. (1994) Antimicrobial properties of roots exudate of three macrophytes: *Mentha aquatica* L., *Phragmites australis* (Cav.) Trin. and *Scirpus lacustris* L. 4th International Conference on Wetland Systems for Water Pollution Control, 6-10 November. China: University of Guangzhou, pp. 290-296
- Vives-Rego, J., Lebaron, P., Caron G., N. (2000) Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews* 24(4), 429-448

- Vymazal, J., Brix, H., Cooper, P.F., Haberl, R., Perfler, R., Laber, J. (1998) Removal mechanisms and types of constructed wetlands. In: Vymazal, J., Brix, H., Cooper, P.F., Green, M.P., Haberl, R. (Ed.), *Constructed wetlands for wastewater treatment in Europe*, Backhuys Publishers: Leiden, Netherlands, pp. 17-66
- Vymazal, J., Duek, J., Kvt, J. (1999) Nutrient uptake and storage by plants in constructed wetlands with horizontal sub-surface flow: A comparative study, in Vymazal J. (Ed.), *Nutrient Cycling and Retention in Natural and Constructed Wetlands*, Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp 85-100
- Vymazal, J. (2001) Types of constructed wetlands for wastewater treatment: Their potential for nutrient removal. in Vymazal J. (Ed.), *Transformations of Nutrients in Natural and Constructed Wetlands*, Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp 1-93
- Vymazal J., Balcarová J. and Doušová H. (2001a). Bacterial dynamics in the sub-surface constructed wetland. *Water Science and Technology*, 44(11-12), 207-209.
- Vymazal, J., Sládeček, V., Stach, J. (2001b) Biota participating in wastewater treatment in a horizontal flow constructed wetland. *Water Science and Technology* 44(11-12), 211-214
- Vymazal, J. (2005) Removal of Enteric Bacteria in Constructed Treatment Wetlands, *Journal of Environmental Science and Health* 40(6-7), 1355-1367
- Vymazal J. and Kröpfelová L. (2005). Growth of *Phragmites australis* and *Phalaris arundinacea* in constructed wetlands for wastewater treatment in the Czech Republic. *Ecological Engineering*, 25(5), 606-621.
- Vymazal, J. (2006) Removal of nutrients in various types of constructed wetlands, *Science of The Total Environment*, In Press, Corrected Proof.
- Wallace, S., Parkin, G., Cross, C. (2001) Cold climate wetlands: Design and performance. *Water Science and Technology*, 44(11-12), 259-265
- Watson, J.T., Reed, S.C., Kadlec, R.H., Knight, R.L., Whitehouse, A.E. (1989) Performance expectations and loading rates for constructed wetlands. In *Constructed wetlands for wastewater treatment: Municipal, industrial and agricultural*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, pp 319-351
- Werker, A.G., Dougherty, J.M., McHenry, J.L., Van Loon, W.A. (2002) Treatment variability for wetland wastewater treatment design in cold climates, *Ecological Engineering* 19(1), 1-11
- Whipps, J.M. (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52(Special Issue), 487-511

- Wießner, A., Kusch, P., Kästner, M., Stottmeister U. (2002a) Abilities of Helophyte Species to Release Oxygen into Rhizospheres with Varying Redox Conditions in Laboratory-Scale Hydroponic Systems. *International Journal of Phytoremediation* 4(1), 1-15
- Wießner A., Kusch P. and Stottmeister U. (2002b). Oxygen release by roots of *Typha latifolia* and *Juncus effusus* in laboratory hydroponic system. *Acta Biotechnologica* 22(1-2), 209-226.
- Wießner, A., Kappelmeyer, U., Kusch, P., Kästner, M. (2005) Influence of the redox condition dynamics on the removal efficiency of a laboratory-scale constructed wetland. *Water Research* 39(1), 248-256
- Wiessner, A., Kappelmeyer, U., Kusch, P., Kästner, M. (2005) Sulphate reduction and the removal of carbon and ammonia in a laboratory-scale constructed wetland. *Water Research*, 39(19), 4643-4650
- Zhu, T., Sikora, F.J. (1995) Ammonium and nitrate removal in vegetated and unvegetated gravel bed microcosm wetlands. *Water Science and Technology* 32(3), 219-228



# **Annexes**

## Annexe 1 : Revue de la littérature

Tableau A1.1 : Études traitant de la densité, l'activité et la diversité microbiennes en marais artificiel

Auteurs	Mesure microbienne			Comparaison	
	Densité	Activité	Diversité	Planté vs non planté	Espèces de plantes
Ahn et al., 2006	non	non	oui	non	non
Baptista <i>et al.</i> , 2003	non	oui	oui	oui	non
Collins <i>et al.</i> , 2004	non	non	oui	oui	non
Criado et Bécaries, 2005	non	non	oui	non	non
Edwards et al., 2006	non	oui	non	non	non
Hatano <i>et al.</i> , 1993	oui	oui	oui	oui	oui
Hatano <i>et al.</i> , 1994	oui	oui	oui	non	non
Ibekwe et al., 2003	non	non	oui	non	non
Kang <i>et al.</i> , 1998	non	oui	non	non	non
Kyambadde <i>et al.</i> (2004)	oui	non	non	non	oui
Larsen et Greenway, 2004	oui	non	non	?	oui
Liang <i>et al.</i> , 2003*	oui	oui	non	non	non
Lloyd <i>et al.</i> , 2004*	non	non	oui	non	non
Münch <i>et al.</i> , 2005	oui	oui	non	oui	non
Nguyen, 2000	oui	oui	non	non	non
Nurk et al., 2005	oui	oui	oui	non	non
Osem et al., 2007	non	non	oui	oui	oui
Ottová et al., 1997	oui	non	oui	non	non
Pollard <i>et al.</i> , 1995	non	oui	non	non	non
Polprasert et Sawaittayothin, 2006	non	non	oui	non	non
Ragusa <i>et al.</i> , 2004*	oui	oui	non	non	non
Scholz <i>et al.</i> , 2001	oui	non	oui	non	non
Shackle <i>et al.</i> , 2000*	non	oui	non	non	non
Silvan et al., 2003	oui	non	non	non	non
Silyn-Roberts et Lewis, 2001*	oui	non	oui	non	non
Silyn-Roberts et Lewis, 2003*	non	non	oui	non	non
Truu <i>et al.</i> , 2005	oui	non	oui	non	non
Vacca et al. 2005	oui	non	oui	oui	non
Vymazal <i>et al.</i> , 2001 <sup>a</sup>	oui	non	non	non	oui
Vymazal <i>et al.</i> , 2001 <sup>b</sup>	non	non	oui	non	non

\* Marais non planté ou ne spécifie pas s'il y a la présence de plantes.

Les articles sur fond gris représentent les recherches qui ont été faites sur l'influence de la présence ou de l'espèce de plante sur la densité, l'activité ou la diversité des microorganismes en marais artificiel.

## Annexe 2 : Installation expérimentale et zones d'échantillonnage

### A2.1 Installation expérimentale

L'expérience a été effectuée en serre à l'aide de quatre microcosmes de 3,6 litres, plantés en monoculture de *Typha angustifolia*, *Phragmites australis*, *Phalaris arundinacea* ainsi qu'un témoin non planté, le tout en six réplicats. Les 24 microcosmes ont été regroupés en 6 « blocs » comprenant chacun 4 microcosmes (les 3 espèces de plantes et le témoin non planté) selon la Figure A2.1. À l'intérieur d'un « bloc » les 4 microcosmes ont été placés selon un ordre aléatoire afin de minimiser l'effet de l'environnement.

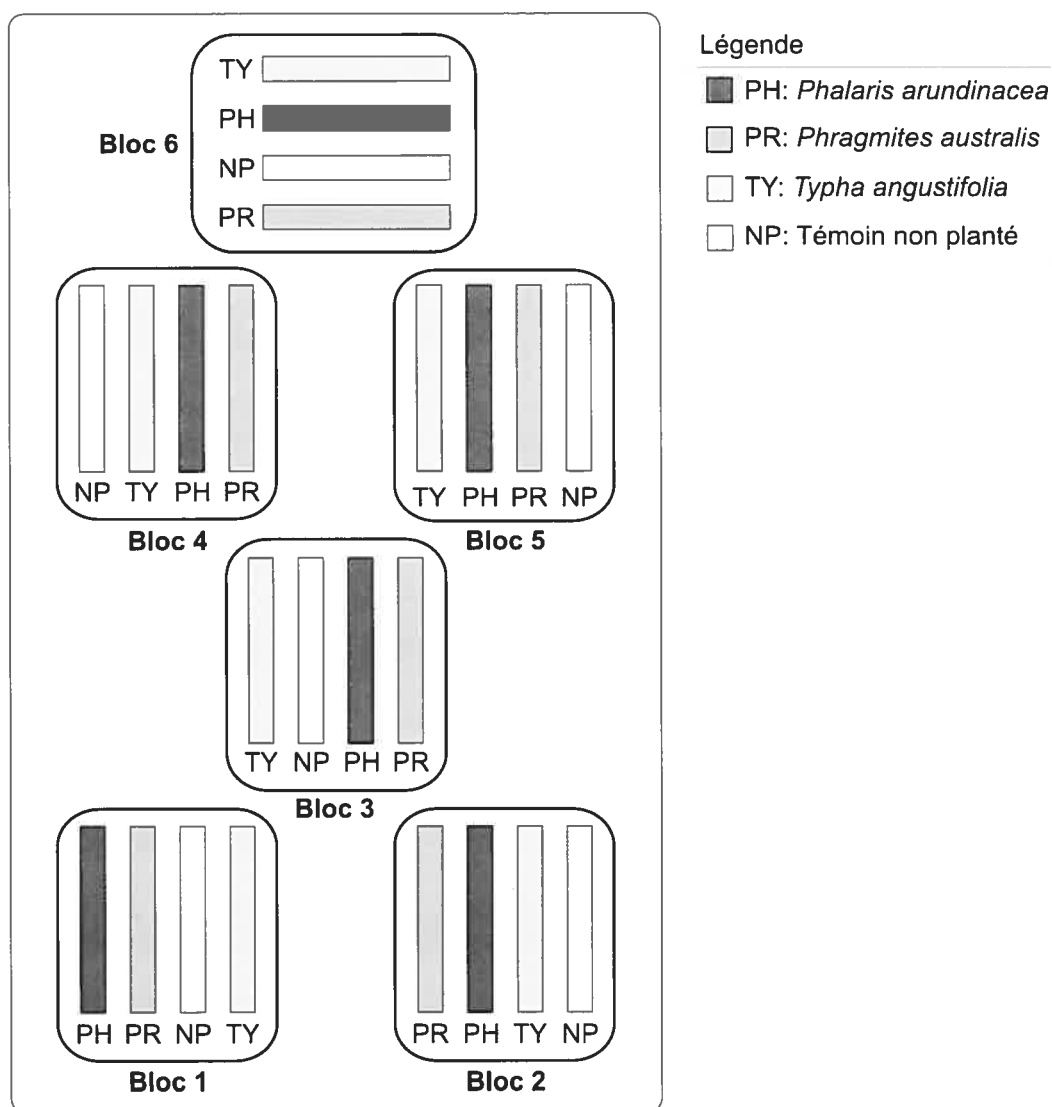


Figure A2.1 : Vue aérienne de la disposition des microcosmes en serre

## A2.2 Description du microcosme

Le microcosme était composé d'un cadre de plastique en forme de U coincé entre deux plaques de verre. Afin de permettre l'échantillonnage sur toute la profondeur, l'une des parois du microcosme était amovible. La dimension externe du microcosme était de 30 cm de hauteur, 30 cm de longueur et 4 cm d'épaisseur. Le microcosme avait du gravier de 20 mm de diamètre dans les zones suivantes : la zone en entrée, la zone inférieure pour la répartition du flux et la zone de sortie. Au centre du microcosme était la région expérimentale composée d'un substrat de sable de silice blanc de 2mm de diamètre. La région expérimentale du microcosme avait une section avec plante et une section sans plante séparées par une membrane de 60 microns empêchant les racines de passer, mais perméable aux microorganismes. Cette séparation permettra de pouvoir échantillonner dans une zone avec des racines et une zone complètement dépourvue de racines (Figure A2.2).

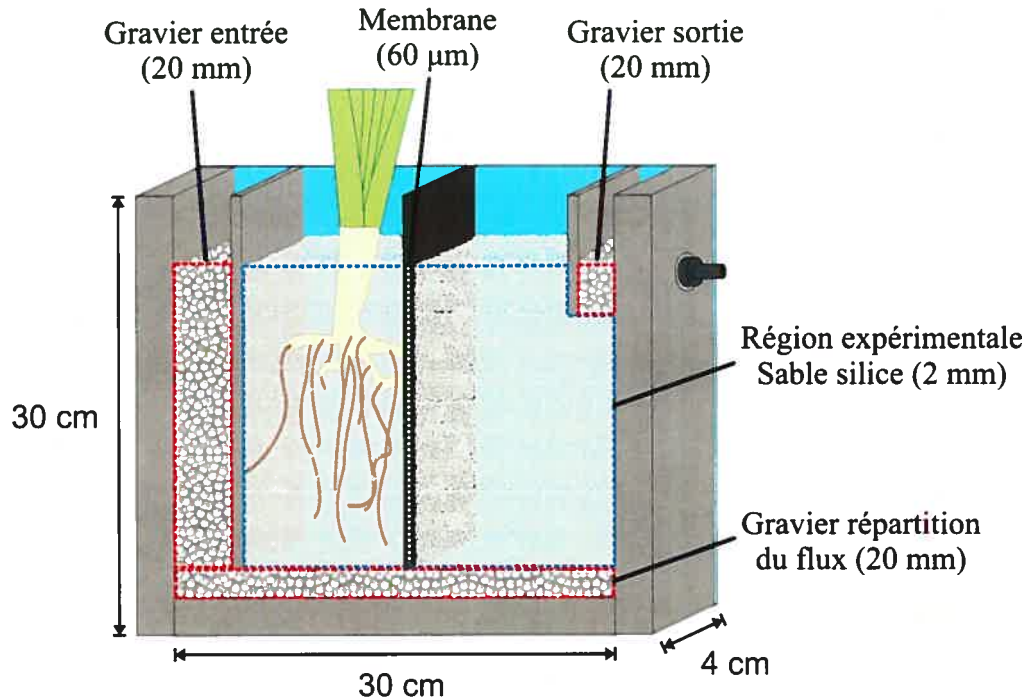


Figure A2.2 : Dimension du microcosme et types de substrats utilisés

### **A2.3 Macrophytes utilisés**

Les plantes ont été produites en culture *in vitro* afin d'obtenir des plantes de même âge et d'une taille comparable. Les *Typha* ont été régénérés à partir de graines, tandis que les *Phragmites* et les *Phalaris* ont été régénérés à partir de nœuds. Après un mois de croissance *in vitro*, les macrophytes ont été plantés en monoculture à une densité de quatre par microcosmes. Les plantes obtenues par culture *in vitro* avaient l'avantage d'être stériles (dépourvue de microorganismes), ce qui permettait de ne pas introduire de façon différentielle des microorganismes dans les microcosmes.

### **A2.4 Alimentation des microcosmes**

Les microcosmes ont été maintenus en eau pendant les deux premiers mois avec une solution d'engrais chimique (engrais : 20-20-20 à 200 ppm et 0.4 g/l de solution d'oligoéléments chélatés) afin de permettre la croissance des macrophytes. Cette solution d'engrais était changée une fois par semaine. Par la suite les microcosmes ont été alimentés avec  $25 \text{ L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$  d'un effluent piscicole reconstitué (1,3 MES; 7,5 DCO; 1,0 TKN en  $\text{g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ). Pour ce faire, un bouteille était remplie de 300 ml d'effluent reconstitué préalablement gelé, qui était mise en entrée du microcosme pour fondre et alimenter le microcosme goutte à goutte.

### **A2.5 Échantillonnages**

L'échantillonnage s'est déroulé en trois phases : (1) le prélèvement de la totalité du liquide interstitiel à deux profondeurs et simultanément dans les deux sections du microcosme, (2) le contenu du microcosme a été prélevé selon le plan d'échantillonnage (figure A2.3) et (3) l'extraction des microorganismes sur le sable et les racines a été effectué.

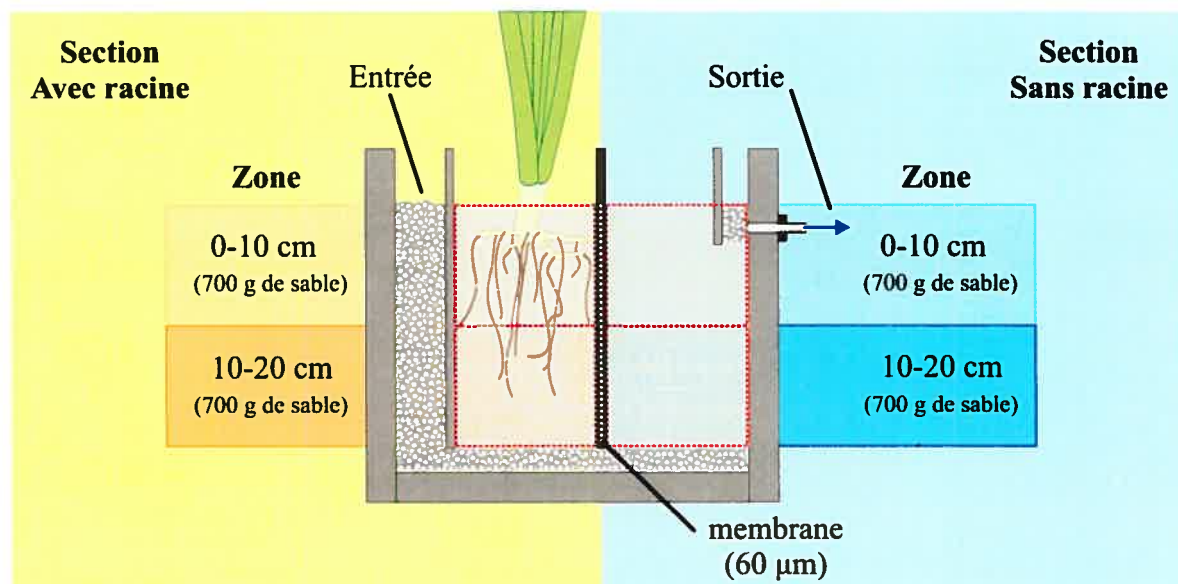


Figure A2.3 : Sections et zones d'échantillonnage du microcosme

- 1) Deux longues pipettes de 1 mL ont été placées à 10 cm de la surface dans les deux sections du microcosme. Le liquide interstitiel de la zone 0-10 cm dans chacune des sections a été pompé lentement (200 mL). Le liquide pompé a été réservé dans deux contenants dûment identifiés et placé à 4°C. Par la suite les deux pipettes ont été descendues jusqu'au fond du microcosme (juste avant la zone de répartition de flux) et le liquide interstitiel de cette zone (10-20 cm) a été pompé (200 mL) dans chacune des sections et placé à 4°C.
- 2) Le microcosme a été ouvert en retirant l'une des parois vitrées. Puis le contenu du microcosme a été séparé selon les zones (0-10 cm, 10-20 cm) et les sections (avec ou sans racines) (voir schéma, figure A1.1). Pour chaque zone d'échantillonnage plantée le sable et les racines ont été séparés et mis dans deux erlenmeyers de 1L.
- 3) L'extraction des microorganismes sur les racines et le sable s'est faite de façon séquentielle. Premièrement, les microorganismes sur les racines ont été extraient par agitation avec 500 mL de tampons phosphate ( $K_2HPO_4$  9.3 g/L;  $KH_2PO_4$  1.8 g/L) durant 5 minutes. Par la suite, le même 500 mL de solution d'extraction a servi pour

extraire les microorganismes sur le sable par une agitation vigoureuse de 5 minutes. La solution d'extraction finale (500 mL d'une combinaison de la solution d'extraction des racines et du sable) a été filtrée grossièrement (112  $\mu\text{m}$ ) afin d'enlever les radicules. La solution d'extraction finale et le liquide interstitiel ont été combinés pour chacune des zones, ce mélange était nommé solution microbienne. Cependant pour un « bloc » de microsomes, l'extraction des microorganismes sur les racines et le sable s'est faite séparément et les mesures de densités et d'activités microbiennes ont été effectuées sur les racines, le sable et le liquide interstitiel afin de déterminer la localisation des microorganismes.

La solution microbienne obtenue a été fractionnée en différents volumes dédiés aux diverses analyses expérimentales. Voici la répartition des volumes selon les expériences et si il y a lieu le prétraitement requis.

- a. **Taux de respiration aérobie** : 500 mL de solution microbienne qui a été conservé à 4°C et analysé en moins d'une heure après l'extraction.
- b. **Matière sèche et volatile** : 10 mL de solution microbienne, qui a été conservée à -20°C et analysée un à deux mois après l'extraction.
- c. **Densité microbienne** : Deux échantillons de 2 mL de la solution microbienne qui ont été fixés avec du glutaraldéhyde (concentration final 1%), conservés à 4°C et a été analysés un mois après l'extraction.
- d. **Analyse de protéine et d'activités microbiennes** : 20 mL de la solution microbienne a été conservée à 4°C et analysé en moins d'une heure après l'extraction.
- e. **Diversité génétique** : Deux échantillons de 2 mL de la solution microbienne ont été centrifugés à 10 000 rpm, le culot a été conservé à -20°C et n'a pas encore été analysé.

La partie aérienne des plantes a été fauchée et séchée afin d'évaluer la biomasse aérienne de chacune des espèces de plantes. Les rhizomes, racines et racines ont été séparés par profondeur (0-10 cm et 10-20 cm) et séchés pour obtenir la biomasse souterraine. Toutefois, un échantillon représentatif de racine fraîche de chacune des espèces de plantes a été scanné et analysé par le programme WinRHIZO™ 4.1c (Regent Instruments Inc., QC, Canada) afin de déterminer leurs surfaces racinaires. Chaque échantillon a été séché et pesé afin de faire le ratio surface/masse sèche de chaque espèce de plantes.



## **Annexe 3 : Protocoles d'analyses expérimentales**

### **A3.1 Mesure de la matière sèche et volatile**

La technique est utilisée afin d'évaluer la quantité de matière organique active et inerte. Une quantité de la solution microbienne a été séchée et transformée en cendre par combustion à 550 °C. La différence de poids entre la solution microbienne sèche et les cendres représente la matière organique volatile (APHA, 1992). Cette mesure n'a pas été intégrée au corps du mémoire, car les données ne montraient pas de variations dignes d'intérêt.

#### **Protocole**

- Peser la tare d'une coupelle en aluminium (Tare)
- Décongeler la solution microbienne et passer au vortex
- Ajouter 5 mL de solution microbienne à la coupelle en aluminium
- Placer la coupelle en aluminium four à 100°C pour 24 heures
- Sortir du four et laisser refroidir pendant 15 minutes et mesurer la masse sèche
- Placer la coupelle en aluminium à 550°C pour 15 minutes
- Sortir du four et laisser refroidir pendant 15 minutes et mesurer la masse des cendres

### **A3.2 Mesure de la quantité de protéines**

Les protéines sont des composantes de toutes les cellules vivantes et a été employée avec succès comme mesure de biomasse de cellules dans les biofilms (Characklis, 1990). L'estimation de la biomasse se fera par le dosage des protéines avec de l'acide bicinchoninique (Smith et al., 1985). Ce composé se colore en présence de protéines et peut être dosé par spectrométrie (Ragusa et al., 2004).

#### **Protocole**

- Dans un tube en verre de 15 ml ajouter 1000 uL de solution microbienne
- Ajouter 100 uL de SDS
- Ajouter 900 uL d'eau distillée
- Agiter (vortex) pendant 2 minutes
- Porter à ébullition 1 minute
- Refroidir 15 minutes
- Ajouter 100 µL de la Solution de Protéine, à 2000 uL de solution de BCA

- Laisser réagir pendant 15 min à 60 °C
- Mesurer l'absorbance à 562 nm

Tableau A3.1 Synthèse du protocole de la mesure de la teneur en protéines

Réactifs	Blanc	Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 3
Solution microbienne	1000 uL	1000 uL	1000 uL	1000 uL
SDS	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Eau distillée	900 uL	900 uL	900 uL	900 uL
Bouillir à 100°C 1 min	↓	↓	↓	↓
Solution microbienne + SDS	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
BCA (15 min à 60°C) Mesuré l'absorbance (562 nm)	0 mL	2000 uL	2000 uL	2000 uL

### A3.3 Mesure de la densité microbienne par cytométrie en flux

#### Protocole

- Agiter (vortex) la solution microbienne
- Pipeter 50 µL de solution microbienne dans un eppendorf de 2 mL
- Ajouter 950 µL de tampon stérile à l'eppendorf de 2 mL
- Centrifuger à 1000 rpm pendant 5 min pour enlever les gains de sable
- Pipeter 400 µL de la solution microbienne diluée à un tube Falcon de 5mL
- Ajouter 4 µL de colorant nucléique (SYTO-13 à 500 µM) à la solution d'extraction (Concentration finale de SYTO-13 [5 µM])
- Agiter (vortex)
- Laisser réagir dans l'obscurité pendant 10 minutes
- Ajouter 10 µL de billes fluorescentes (1 µm) d'une concentration connue
- Lire avec le cytomètre

#### Paramètre du cytomètre en flux

Forward scatter (FSC) = E 02

Side scatter (SSC): 380

Fluorescence 1 (FL1): 500

### A3.4 Mesure de l'activité de déshydrogénase

Des sels de Tetrazolium (par exemple INT) sont employés comme indicateurs de la respiration bactérienne. Puisque la respiration est étroitement associée au métabolisme cellulaire, la détection de l'activité de déshydrogénase par réduction INT en Formazan est

un bon indicateur de l'activité biologique (Ragusa et al., 2004). Les mesures de respiration par l'INT ont été corrélées avec d'autres mesures d'activité biologique comme le taux de consommation d'oxygène (Trevors et al., 1984), et la mesure d'ATP (Ragusa et al., 2004). De plus, la mesure par l'INT permet d'évaluer la respiration totale des eucaryotes et des procaryotes en condition de respiration aérobie et anaérobie (Smith et al., 1997).

### Protocole

- Identifier 4 tubes eppendorf de 2 mL, dont 0 représente le blanc et 1 à 3 les réplicats
- Tube 0,1,2,3 : Mettre 1000 uL de la solution microbienne
- Tube 0 : Mettre 250 ul de formaldéhyde 1 min avant l'INT (Tuer les microorganismes)
- Tubes 0,1,2,3 : Ajouter 250 ul d'INT
- Agiter (vortex) 2 minutes et laisser réagir 60 minutes (précises) à l'obscurité.
- Tubes 1,2,3 : Ajouter 250 ul de formaldéhyde pour arrêter la réaction
- Centrifuger le 4 tubes à 5000 rpm pour 10 min, puis éliminer le surnageant
- Tube 0,1,2,3 : Reprendre le culot avec 1 ml de méthanol (1% de tritium x100)
- Agiter vigoureusement au vortex pendant 30 sec
- Extraire l'INT-formazan pendant 20 min à l'obscurité
- Centrifuger à 10 000 rpm pour 5 min
- Mesurer l'absorbance du surnageant à 480 nm

Tableau A3.2 Synthèse du protocole de la mesure de l'activité de déshydrogénase

	<b>Tube 0</b>	<b>Tube 1</b>	<b>Tube 2</b>	<b>Tube 3</b>
<b>Réactifs</b>	<b>Blanc</b>	<b>Réplicat 1</b>	<b>Réplicat 2</b>	<b>Réplicat 3</b>
<b>Solution microbienne</b>	1000 uL	1000 uL	1000 uL	1000 uL
<b>Formaldéhyde (1min avant l'INT)</b>	250 µL	0 µL	0 µL	0 µL
<b>INT (4mM)</b>	250 uL	250 uL	250 uL	250 uL
<b>Temps de réaction</b>	60 min	60 min	60 min	60 min
<b>Formaldéhyde</b>	0	250 uL	250 uL	250 uL
<b>Centrifuger (5000 rpm)</b>	10 min	10 min	10 min	10 min
<b>Méthanol (1% de tritium x100)</b>	1000 uL	1000 uL	1000 uL	1000 uL
<b>Extraction de l'INT-formazan</b>	20 min	20 min	20 min	20 min
<b>Centrifuger (10 000 rpm)</b>	5 min	5 min	5 min	5 min
<b>Mesurer l'absorbance (480nm)</b>				

### A3.5 Mesure de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique peut être mesurée par l'hydrolyse de la fluoresceine diacetate (FDA) sous l'action d'enzymes non spécifiques comme les estérases, les protéases et les lipases. Des études ont démontré que le FDA est fortement corrélé avec d'autres mesures d'activité biologique de haute précision comme la mesure d'ATP et l'incorporation de thymidine radioactive à l'ADN (Adam et Duncan, 2001).

#### Protocole

- Identifier 4 tubes eppendorf de 2 mL, dont 0 représente le blanc et 1 à 3 les réplicats
- Tube 0,1,2,3 : Mettre 1000 uL de la solution microbienne
- Tube 1,2,3 : Ajouter 20  $\mu\text{L}$  d'une solution de FDA ( $2\text{mg mL}^{-1}$ )
- Agiter (vortex) les tubes
- Incuber à 30 °C durant 30 minutes sous agitation
- Tube 0,1,2,3 : Arrêter la réaction 500 uL d'un mélange Chloroforme/Méthanol (2:1)
- Agiter (vortex) les tubes
- Centrifuger à 10 000 rpm pour 5 minutes
- Prélever la phase aqueuse (au dessus) et la placer dans une cuve spectro
- Lire l'absorbance du surnageant à 490 nm

Tableau A3.3 Synthèse du protocole de la mesure de l'activité enzymatique

	<b>Tube 0</b>	<b>Tube 1</b>	<b>Tube 2</b>	<b>Tube 3</b>
<b>Réactifs</b>	<b>Blanc</b>	<b>Réplicat 1</b>	<b>Réplicat 2</b>	<b>Réplicat 3</b>
<b>Solution microbienne</b>	1000 uL	1000 uL	1000 uL	1000 uL
<b>Solution de FDA (<math>2\text{mg mL}^{-1}</math>)</b>	0 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$
<b>Temps de réaction</b>	30 min	30 min	30 min	30 min
<b>Mélange Chloroforme/Méthanol</b>	500 uL	500 uL	500 uL	500 uL
<b>Centrifuger (10 000 rpm)</b>	5 min	5 min	5 min	5min
<b>Mesurer l'absorbance (490nm)</b>				

### **A3.6 Mesure du potentiel de la respiration aérobie**

La respiration peut être mesurée par un respiromètre, un instrument qui quantifie la quantité potentielle d'oxygène utilisée par les microorganismes présents dans le milieu. Cette mesure de respiration se fera sur la solution microbienne rapidement après son extraction avec un respiromètre (AER-200, Challenge Environmental Systems, Inc, Arkansas, USA).

#### **Protocole**

- Mettre 500 mL de la solution microbienne dans un flacon de 1L
- Mettre 4 ml de KOH (35%) dans la trappe à CO<sub>2</sub>.
- Mettre un barreau alimenté et agiter à 800 rpm
- Brancher le flacon après le respiromètre
- Prendre des mesure durant 5 heures à toute les 5 minutes

## Annexe 4 : Compilation des données expérimentales

### A4.1 Matière sèche et volatile, Protéines et densité microbienne

• **Matière sèche** :  $=((\text{Poids à } 100^{\circ}\text{C} - \text{Poids Tare})/\text{Vol. initial}) * \text{Vol. total}$

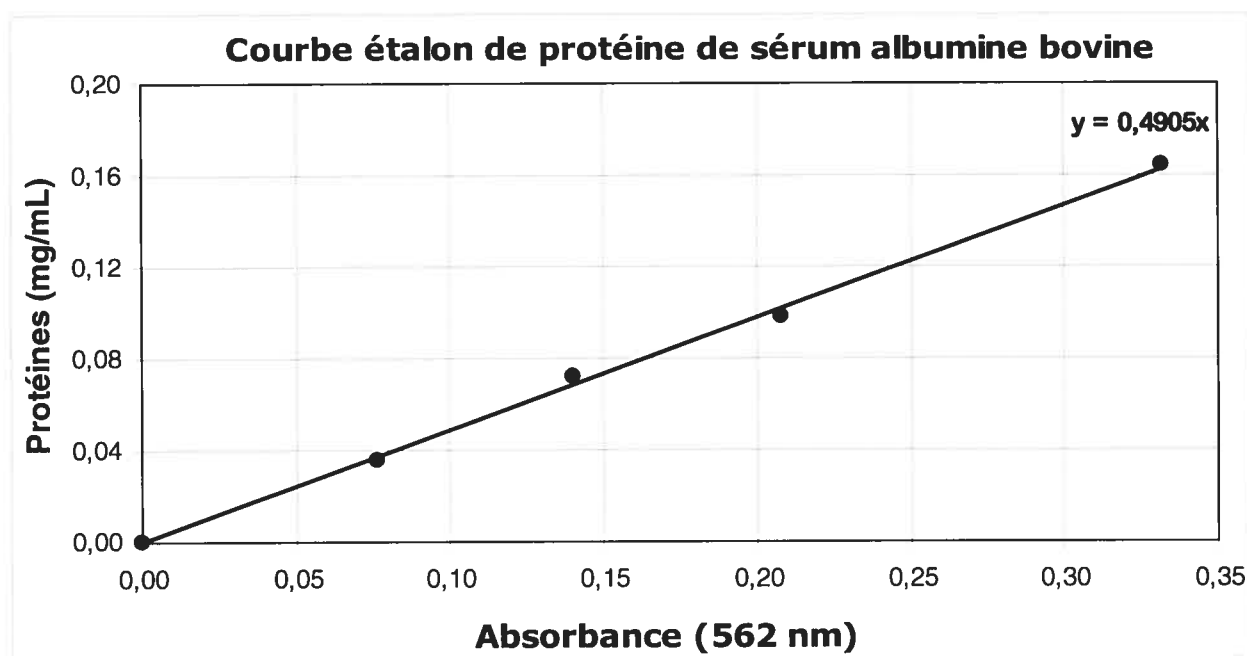
- Poids à 100°C : Poids de la solution microbienne séchée à 100 °C
- Poids Tare : Poids de la coupelle en métal
- Vol. initial : Volume de la solution microbienne utilisé (5 mL)
- Vol. total : Volume de la solution microbienne pour une zone (700 mL)

• **Matière volatile** :  $=((\text{Poids à } 100^{\circ}\text{C} - \text{Poids à } 550^{\circ}\text{C})/\text{Vol. initial}) * \text{Vol. total}$

- Poids à 100°C : Poids de la solution microbienne séchée à 100 °C
- Poids à 550°C : Poids de la solution microbienne brûlée à 550 °C
- Vol. séché : Volume de la solution microbienne utilisé (5 mL)
- Vol. total : Volume total de la solution microbienne pour une zone (700 mL)

• **Protéines** :  $= (0,4905 * x) * \text{Vol. total}$

- x : Absorbance de l'échantillon - Absorbance du blanc
- Vol. total : Volume total de la solution microbienne pour une zone (700 mL)



• **Densité microbienne** :  $= (\text{Nb. évènement}/\text{Vol. passé}) * \text{Dilution} * \text{Vol. total}$

- Nb. évènement: Nombre de microorganismes lu par le cytomètre en flux
- Vol. passé : Volume qui a passé dans le cytomètre en flux
- Dilution : Dilution (20 x)
- Vol. total : Volume de la solution microbienne pour une zone (700 mL)

Tableau A4.1.1 : Les résultats calculés de la section avec racine des microcosmes

Bloc	Espèces	Section	Zone	Matière Sèche g MS zone <sup>-1</sup>	Matière Volatile g MV zone <sup>-1</sup>	Protéine mg Prot zone <sup>-1</sup>	Densité bactérienne Bactérie zone <sup>-1</sup>
1	Non planté	Avec Racine	0-10 cm	11,12	3,59	6,77	1,44 x 10 <sup>10</sup>
3	Non planté	Avec Racine	0-10 cm	7,65	2,30	8,13	1,23 x 10 <sup>10</sup>
4	Non planté	Avec Racine	0-10 cm	9,81	2,88	5,33	1,21 x 10 <sup>10</sup>
5	Non planté	Avec Racine	0-10 cm	9,65	1,25	6,50	ND
6	Non planté	Avec Racine	0-10 cm	10,21	2,62	13,95	1,70 x 10 <sup>10</sup>
1	Non planté	Avec Racine	10-20 cm	9,97	3,31	1,91	5,85 x 10 <sup>9</sup>
3	Non planté	Avec Racine	10-20 cm	8,60	2,44	0,10	5,44 x 10 <sup>9</sup>
4	Non planté	Avec Racine	10-20 cm	8,88	2,52	1,87	4,51 x 10 <sup>9</sup>
5	Non planté	Avec Racine	10-20 cm	11,12	1,29	2,88	ND
6	Non planté	Avec Racine	10-20 cm	8,96	2,42	5,92	5,49 x 10 <sup>9</sup>
1	<i>Phalaris</i>	Avec Racine	0-10 cm	13,56	5,46	19,84	1,78 x 10 <sup>11</sup>
3	<i>Phalaris</i>	Avec Racine	0-10 cm	9,87	3,28	24,70	3,08 x 10 <sup>11</sup>
4	<i>Phalaris</i>	Avec Racine	0-10 cm	9,46	2,93	37,03	3,45 x 10 <sup>11</sup>
5	<i>Phalaris</i>	Avec Racine	0-10 cm	9,99	3,01	26,92	ND
6	<i>Phalaris</i>	Avec Racine	0-10 cm	6,09	1,91	32,28	3,39 x 10 <sup>11</sup>
1	<i>Phalaris</i>	Avec Racine	10-20 cm	12,17	4,63	6,18	1,54 x 10 <sup>11</sup>
3	<i>Phalaris</i>	Avec Racine	10-20 cm	8,91	2,67	6,25	6,11 x 10 <sup>10</sup>
4	<i>Phalaris</i>	Avec Racine	10-20 cm	8,81	2,52	13,51	6,21 x 10 <sup>10</sup>
5	<i>Phalaris</i>	Avec Racine	10-20 cm	9,16	2,55	13,44	ND
6	<i>Phalaris</i>	Avec Racine	10-20 cm	4,42	1,16	11,31	6,32 x 10 <sup>10</sup>
1	<i>Phragmites</i>	Avec Racine	0-10 cm	12,53	3,90	17,77	1,14 x 10 <sup>11</sup>
3	<i>Phragmites</i>	Avec Racine	0-10 cm	8,92	2,60	7,62	5,60 x 10 <sup>10</sup>
4	<i>Phragmites</i>	Avec Racine	0-10 cm	7,40	2,34	7,64	2,55 x 10 <sup>10</sup>
5	<i>Phragmites</i>	Avec Racine	0-10 cm	11,35	3,21	30,38	ND
6	<i>Phragmites</i>	Avec Racine	0-10 cm	7,47	2,41	11,13	8,69 x 10 <sup>10</sup>
1	<i>Phragmites</i>	Avec Racine	10-20 cm	12,01	4,23	8,65	6,76 x 10 <sup>10</sup>
3	<i>Phragmites</i>	Avec Racine	10-20 cm	8,79	2,42	3,61	2,78 x 10 <sup>10</sup>
4	<i>Phragmites</i>	Avec Racine	10-20 cm	8,37	2,71	6,61	1,83 x 10 <sup>10</sup>
5	<i>Phragmites</i>	Avec Racine	10-20 cm	11,68	2,09	21,88	ND
6	<i>Phragmites</i>	Avec Racine	10-20 cm	12,11	4,09	8,33	4,01 x 10 <sup>10</sup>
1	<i>Typha</i>	Avec Racine	0-10 cm	11,17	3,46	20,16	4,91 x 10 <sup>10</sup>

3	<i>Typha</i>	Avec Racine	0-10 cm	9,91	3,11	16,90	7,95 x 10 <sup>10</sup>
4	<i>Typha</i>	Avec Racine	0-10 cm	8,76	2,93	22,08	1,08 x 10 <sup>11</sup>
5	<i>Typha</i>	Avec Racine	0-10 cm	10,06	3,04	24,05	ND
6	<i>Typha</i>	Avec Racine	0-10 cm	6,63	2,09	17,16	8,61 x 10 <sup>10</sup>
1	<i>Typha</i>	Avec Racine	10-20 cm	9,81	3,49	6,54	1,95 x 10 <sup>10</sup>
3	<i>Typha</i>	Avec Racine	10-20 cm	9,02	2,95	2,81	1,44 x 10 <sup>10</sup>
4	<i>Typha</i>	Avec Racine	10-20 cm	8,92	2,62	8,90	4,36 x 10 <sup>10</sup>
5	<i>Typha</i>	Avec Racine	10-20 cm	8,87	2,57	6,14	ND
6	<i>Typha</i>	Avec Racine	10-20 cm	7,16	3,12	5,12	2,98 x 10 <sup>10</sup>

Tableau A4.1.2 : Les résultats calculés de la section sans racine des microcosmes

Bloc	Espèces	Section	Zone	Matière Sèche g MS zone <sup>-1</sup>	Matière Volatile g MV zone <sup>-1</sup>	Protéine mg Prot zone <sup>-1</sup>	Densité bactérienne Bactérie zone <sup>-1</sup>
1	Non planté	Sans Racine	0-10 cm	11,08	3,46	4,60	1,34 x 10 <sup>10</sup>
3	Non planté	Sans Racine	0-10 cm	9,80	2,76	5,40	2,21 x 10 <sup>10</sup>
4	Non planté	Sans Racine	0-10 cm	8,85	2,59	3,08	8,92 x 10 <sup>9</sup>
5	Non planté	Sans Racine	0-10 cm	10,23	1,20	5,83	ND
6	Non planté	Sans Racine	0-10 cm	9,93	2,67	7,85	4,81 x 10 <sup>10</sup>
1	Non planté	Sans Racine	10-20 cm	10,53	3,56	1,96	4,14 x 10 <sup>9</sup>
3	Non planté	Sans Racine	10-20 cm	9,47	2,71	0,15	6,22 x 10 <sup>9</sup>
4	Non planté	Sans Racine	10-20 cm	9,28	2,79	3,01	7,33 x 10 <sup>9</sup>
5	Non planté	Sans Racine	10-20 cm	10,90	1,25	3,84	ND
6	Non planté	Sans Racine	10-20 cm	10,16	2,54	13,58	2,08 x 10 <sup>10</sup>
1	<i>Phalaris</i>	Sans Racine	0-10 cm	15,30	4,74	4,39	2,19 x 10 <sup>10</sup>
3	<i>Phalaris</i>	Sans Racine	0-10 cm	8,74	2,62	4,66	3,45 x 10 <sup>10</sup>
4	<i>Phalaris</i>	Sans Racine	0-10 cm	9,05	2,49	4,30	6,65 x 10 <sup>9</sup>
5	<i>Phalaris</i>	Sans Racine	0-10 cm	10,02	2,46	9,27	ND
6	<i>Phalaris</i>	Sans Racine	0-10 cm	5,55	1,39	4,53	4,37 x 10 <sup>10</sup>
1	<i>Phalaris</i>	Sans Racine	10-20 cm	12,86	4,32	0,70	6,95 x 10 <sup>9</sup>
3	<i>Phalaris</i>	Sans Racine	10-20 cm	9,55	2,77	3,04	6,85 x 10 <sup>9</sup>
4	<i>Phalaris</i>	Sans Racine	10-20 cm	7,88	2,21	3,98	3,52 x 10 <sup>9</sup>
5	<i>Phalaris</i>	Sans Racine	10-20 cm	9,86	2,30	8,74	ND
6	<i>Phalaris</i>	Sans Racine	10-20 cm	7,58	1,25	9,02	3,54 x 10 <sup>10</sup>
1	<i>Phragmites</i>	Sans Racine	0-10 cm	12,70	4,27	12,71	1,73 x 10 <sup>10</sup>



3	<i>Phragmites</i>	Sans Racine	0-10 cm	9,14	2,69	4,07	$1,13 \times 10^{10}$
4	<i>Phragmites</i>	Sans Racine	0-10 cm	9,12	2,73	4,89	$8,28 \times 10^9$
5	<i>Phragmites</i>	Sans Racine	0-10 cm	9,38	1,75	14,73	ND
6	<i>Phragmites</i>	Sans Racine	0-10 cm	14,13	3,70	6,20	$4,70 \times 10^{10}$
1	<i>Phragmites</i>	Sans Racine	10-20 cm	12,25	4,38	3,20	$1,21 \times 10^{10}$
3	<i>Phragmites</i>	Sans Racine	10-20 cm	6,92	1,98	2,37	$1,05 \times 10^{10}$
4	<i>Phragmites</i>	Sans Racine	10-20 cm	9,50	2,87	4,30	$1,04 \times 10^{10}$
5	<i>Phragmites</i>	Sans Racine	10-20 cm	10,33	2,34	13,60	ND
6	<i>Phragmites</i>	Sans Racine	10-20 cm	11,47	3,21	1,96	$1,35 \times 10^{10}$
1	<i>Typha</i>	Sans Racine	0-10 cm	12,23	3,56	6,47	$1,15 \times 10^{10}$
3	<i>Typha</i>	Sans Racine	0-10 cm	8,78	2,71	5,74	$9,62 \times 10^9$
4	<i>Typha</i>	Sans Racine	0-10 cm	9,03	2,94	5,76	$1,22 \times 10^{10}$
5	<i>Typha</i>	Sans Racine	0-10 cm	9,58	2,64	5,70	ND
6	<i>Typha</i>	Sans Racine	0-10 cm	6,97	1,94	4,71	$2,20 \times 10^{10}$
1	<i>Typha</i>	Sans Racine	10-20 cm	12,08	3,59	3,45	$7,61 \times 10^9$
3	<i>Typha</i>	Sans Racine	10-20 cm	9,08	2,68	0,29	$4,43 \times 10^9$
4	<i>Typha</i>	Sans Racine	10-20 cm	8,26	2,31	4,07	$8,33 \times 10^9$
5	<i>Typha</i>	Sans Racine	10-20 cm	8,71	2,58	3,29	ND
6	<i>Typha</i>	Sans Racine	10-20 cm	8,71	2,49	1,96	$7,69 \times 10^9$

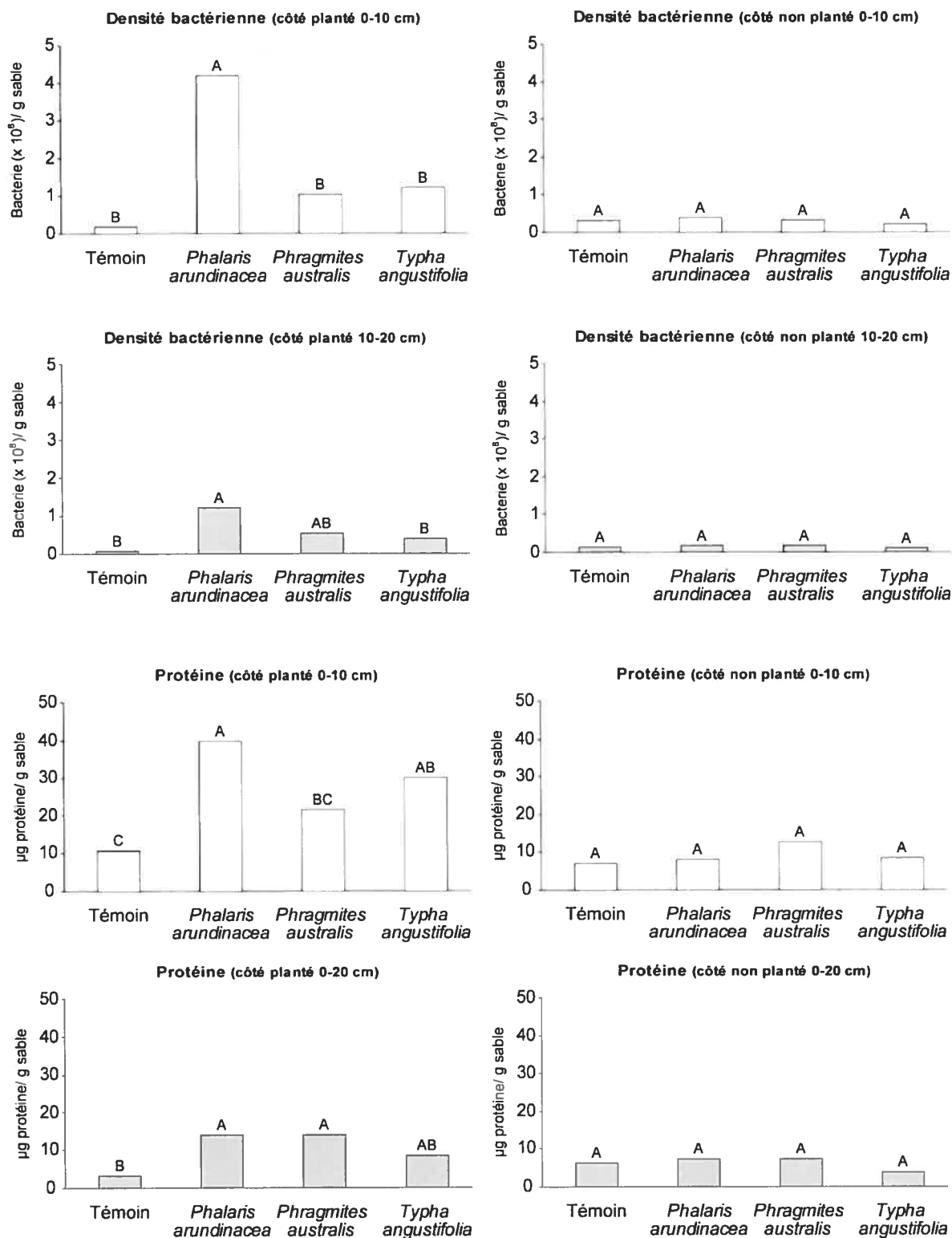


Figure A4.1: Densité microbienne et concentration en protéine par masse de sable selon la zone (0-10 cm 10-20 cm) et la section du microcosme (côté planté et côté non planté) (A,B valeur significative  $P < 0.05$ ).

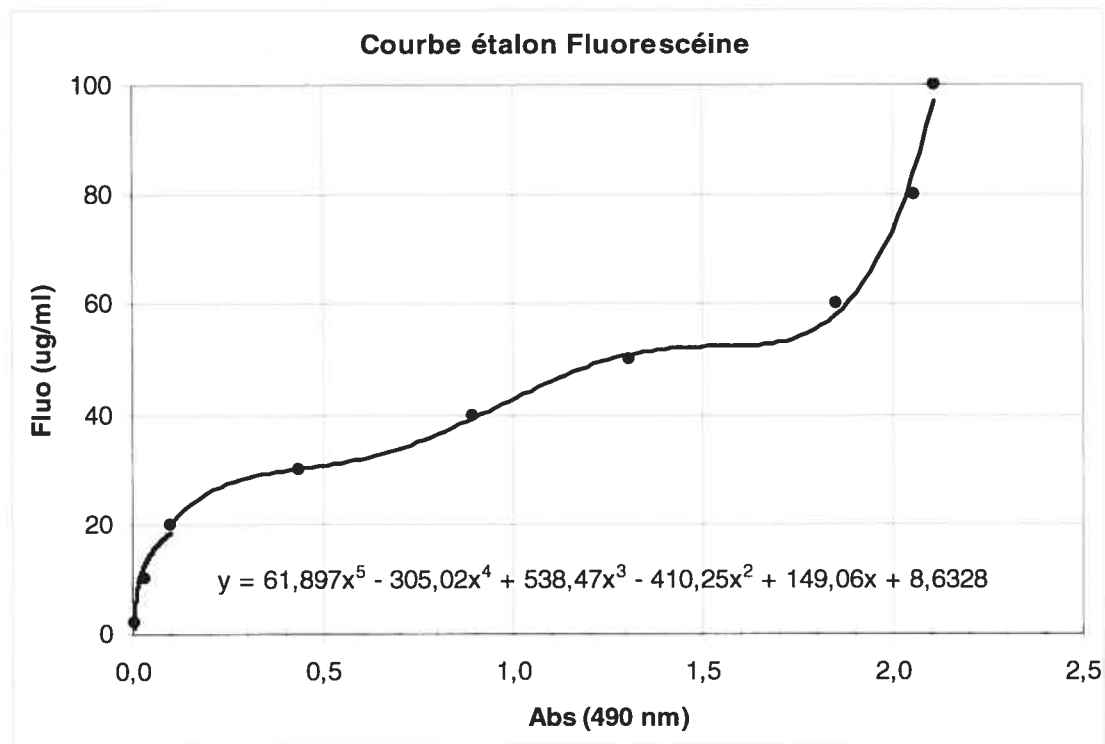
## A4.2 Activité enzymatique, déshydrogénase et taux de respiration aérobie

• **Déshydrogénase** :  $=((\text{Abs. INT-F échantillon} - \text{Abs. INT-F blanc})/15500)*\text{Vol. total}$

- Abs. INT-F échantillon : Absorbance de l'INT-F de l'échantillon
- Abs. INT-F blanc : Absorbance de l'INT-F tué au formaldéhyde
- 15500 :  $\epsilon_{480, \text{INT}} = 15500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Trevors *et al.*, 1982)
- Vol. total : Volume de la solution microbienne pour une zone (700 mL)

• **Activité enzymatique** :  $=((61,897x^5 - 305,02x^4 + 538,47x^3 - 410,25x^2 + 149,06x + 8,6328) / \text{Temps de réaction}) * \text{Vol. total}$

- $x$  : Absorbance de l'FDA de l'échantillon - Absorbance sans FDA
- Temps de réaction: 0.5 heure
- Vol. total : Volume de la solution microbienne pour une zone (700 mL)



• **Taux de respiration aérobie** :  $=((\text{Masse O}_2 / \text{Vol. d'échantillon})/\text{Nb. heure})*\text{Vol total}$

- Masse O<sub>2</sub> : Quantité d'oxygène consommée
- Vol. d'échantillon : Volume de l'échantillon dans le respiromètre (500 mL)
- Nb. heure : Nombre d'heure passé dans le respiromètre (10 heures)
- Vol. total : Volume de la solution microbienne pour une zone (700 mL)

### Référence :

Trevors, J. T., Mayfield, C. I., and Inniss, W. E. (1982) "Measurement of Electron Transport System (ETS) Activity in Soil," *Microbial Ecology* 8:163-168.

Tableau A4.2.1 : Les résultats calculés de la section avec racine des microcosmes

Bloc	Espèces	Section	Zone	Activité de déshydrogénase mol INT-F hr <sup>-1</sup> zone <sup>-1</sup>	Activité enzymatique mg Fluo hr <sup>-1</sup> zone <sup>-1</sup>	Taux de respiration aérobie mg O <sub>2</sub> hr <sup>-1</sup> zone <sup>-1</sup>
1	Non planté	Avec Racine	0-10 cm	1,63 x 10 <sup>-6</sup>	39,58	2,08
3	Non planté	Avec Racine	0-10 cm	5,19 x 10 <sup>-6</sup>	36,64	1,00
4	Non planté	Avec Racine	0-10 cm	3,12 x 10 <sup>-6</sup>	38,27	0,05
5	Non planté	Avec Racine	0-10 cm	1,64 x 10 <sup>-6</sup>	43,55	0,18
6	Non planté	Avec Racine	0-10 cm	8,10 x 10 <sup>-6</sup>	40,75	2,64
1	Non planté	Avec Racine	10-20 cm	5,27 x 10 <sup>-7</sup>	17,50	1,33
3	Non planté	Avec Racine	10-20 cm	1,64 x 10 <sup>-6</sup>	17,26	1,66
4	Non planté	Avec Racine	10-20 cm	2,05 x 10 <sup>-6</sup>	22,45	0,03
5	Non planté	Avec Racine	10-20 cm	1,35 x 10 <sup>-6</sup>	21,12	0,07
6	Non planté	Avec Racine	10-20 cm	2,47 x 10 <sup>-6</sup>	20,43	1,94
1	<i>Phalaris</i>	Avec Racine	0-10 cm	2,13 x 10 <sup>-5</sup>	103,08	13,29
3	<i>Phalaris</i>	Avec Racine	0-10 cm	2,44 x 10 <sup>-5</sup>	125,95	19,43
4	<i>Phalaris</i>	Avec Racine	0-10 cm	2,89 x 10 <sup>-5</sup>	156,97	13,38
5	<i>Phalaris</i>	Avec Racine	0-10 cm	2,44 x 10 <sup>-5</sup>	140,79	8,50
6	<i>Phalaris</i>	Avec Racine	0-10 cm	1,90 x 10 <sup>-5</sup>	133,65	9,08
1	<i>Phalaris</i>	Avec Racine	10-20 cm	2,30 x 10 <sup>-5</sup>	69,51	3,46
3	<i>Phalaris</i>	Avec Racine	10-20 cm	1,61 x 10 <sup>-5</sup>	44,04	1,90
4	<i>Phalaris</i>	Avec Racine	10-20 cm	1,58 x 10 <sup>-5</sup>	59,58	2,25
5	<i>Phalaris</i>	Avec Racine	10-20 cm	2,41 x 10 <sup>-5</sup>	62,99	4,55
6	<i>Phalaris</i>	Avec Racine	10-20 cm	1,67 x 10 <sup>-5</sup>	56,02	6,26
1	<i>Phragmites</i>	Avec Racine	0-10 cm	1,18 x 10 <sup>-5</sup>	73,54	4,72
3	<i>Phragmites</i>	Avec Racine	0-10 cm	7,75 x 10 <sup>-6</sup>	71,03	1,53
4	<i>Phragmites</i>	Avec Racine	0-10 cm	4,65 x 10 <sup>-6</sup>	44,41	0,39
5	<i>Phragmites</i>	Avec Racine	0-10 cm	2,38 x 10 <sup>-5</sup>	106,49	6,98
6	<i>Phragmites</i>	Avec Racine	0-10 cm	1,56 x 10 <sup>-5</sup>	84,07	2,64
1	<i>Phragmites</i>	Avec Racine	10-20 cm	1,30 x 10 <sup>-5</sup>	44,83	4,10
3	<i>Phragmites</i>	Avec Racine	10-20 cm	3,64 x 10 <sup>-6</sup>	42,51	0,24
4	<i>Phragmites</i>	Avec Racine	10-20 cm	3,52 x 10 <sup>-6</sup>	42,23	0,29
5	<i>Phragmites</i>	Avec Racine	10-20 cm	2,49 x 10 <sup>-5</sup>	84,14	3,49
6	<i>Phragmites</i>	Avec Racine	10-20 cm	1,68 x 10 <sup>-5</sup>	73,01	2,32
1	<i>Typha</i>	Avec Racine	0-10 cm	3,60 x 10 <sup>-6</sup>	72,53	2,80

3	<i>Typha</i>	Avec Racine	0-10 cm	$8,34 \times 10^{-6}$	72,46	3,64
4	<i>Typha</i>	Avec Racine	0-10 cm	$1,29 \times 10^{-5}$	130,42	7,42
5	<i>Typha</i>	Avec Racine	0-10 cm	$3,60 \times 10^{-5}$	82,60	0,40
6	<i>Typha</i>	Avec Racine	0-10 cm	$2,07 \times 10^{-5}$	101,41	6,81
1	<i>Typha</i>	Avec Racine	10-20 cm	$1,32 \times 10^{-6}$	41,46	1,96
3	<i>Typha</i>	Avec Racine	10-20 cm	$2,69 \times 10^{-6}$	40,77	0,65
4	<i>Typha</i>	Avec Racine	10-20 cm	$5,58 \times 10^{-6}$	73,05	1,39
5	<i>Typha</i>	Avec Racine	10-20 cm	$1,12 \times 10^{-5}$	41,37	0,10
6	<i>Typha</i>	Avec Racine	10-20 cm	$5,93 \times 10^{-6}$	57,23	1,91

Tableau A4.2.2 : Les résultats calculés de la section sans racine des microcosmes

Bloc	Espèces	Section	Zone	Activité de déshydrogénase mol INT-F hr <sup>-1</sup> zone <sup>-1</sup>	Activité enzymatique mg Fluo hr <sup>-1</sup> zone <sup>-1</sup>	Taux de respiration aérobie mg O <sub>2</sub> hr <sup>-1</sup> zone <sup>-1</sup>
1	Non planté	Sans Racine	0-10 cm	$1,85 \times 10^{-6}$	39,44	1,50
3	Non planté	Sans Racine	0-10 cm	$8,82 \times 10^{-6}$	41,14	4,82
4	Non planté	Sans Racine	0-10 cm	$4,08 \times 10^{-6}$	32,88	3,37
5	Non planté	Sans Racine	0-10 cm	$1,18 \times 10^{-5}$	43,64	0,11
6	Non planté	Sans Racine	0-10 cm	$9,98 \times 10^{-6}$	40,11	5,46
1	Non planté	Sans Racine	10-20 cm	$4,06 \times 10^{-7}$	16,90	0,58
3	Non planté	Sans Racine	10-20 cm	$1,14 \times 10^{-6}$	18,95	1,04
4	Non planté	Sans Racine	10-20 cm	$2,29 \times 10^{-6}$	25,03	0,00
5	Non planté	Sans Racine	10-20 cm	$1,87 \times 10^{-6}$	17,85	0,06
6	Non planté	Sans Racine	10-20 cm	$3,31 \times 10^{-6}$	23,75	1,13
1	<i>Phalaris</i>	Sans Racine	0-10 cm	$6,23 \times 10^{-6}$	38,50	1,08
3	<i>Phalaris</i>	Sans Racine	0-10 cm	$3,12 \times 10^{-6}$	37,91	0,29
4	<i>Phalaris</i>	Sans Racine	0-10 cm	$1,92 \times 10^{-6}$	37,02	0,00
5	<i>Phalaris</i>	Sans Racine	0-10 cm	$8,04 \times 10^{-6}$	40,74	0,30
6	<i>Phalaris</i>	Sans Racine	0-10 cm	$4,89 \times 10^{-6}$	40,24	0,82
1	<i>Phalaris</i>	Sans Racine	10-20 cm	$4,37 \times 10^{-6}$	24,40	0,60
3	<i>Phalaris</i>	Sans Racine	10-20 cm	$3,78 \times 10^{-6}$	27,26	0,00
4	<i>Phalaris</i>	Sans Racine	10-20 cm	$1,63 \times 10^{-6}$	23,85	0,00
5	<i>Phalaris</i>	Sans Racine	10-20 cm	$3,40 \times 10^{-6}$	25,56	0,31
6	<i>Phalaris</i>	Sans Racine	10-20 cm	$4,35 \times 10^{-6}$	31,90	0,65
1	<i>Phragmites</i>	Sans Racine	0-10 cm	$5,31 \times 10^{-6}$	40,87	4,72

3	<i>Phragmites</i>	Sans Racine	0-10 cm	$3,42 \times 10^{-6}$	24,77	0,00
4	<i>Phragmites</i>	Sans Racine	0-10 cm	$3,40 \times 10^{-6}$	34,01	0,00
5	<i>Phragmites</i>	Sans Racine	0-10 cm	$1,58 \times 10^{-5}$	46,48	1,01
6	<i>Phragmites</i>	Sans Racine	0-10 cm	$1,10 \times 10^{-5}$	42,02	0,52
1	<i>Phragmites</i>	Sans Racine	10-20 cm	$1,25 \times 10^{-6}$	20,70	0,53
3	<i>Phragmites</i>	Sans Racine	10-20 cm	$2,15 \times 10^{-6}$	24,22	0,00
4	<i>Phragmites</i>	Sans Racine	10-20 cm	$2,71 \times 10^{-6}$	32,61	0,00
5	<i>Phragmites</i>	Sans Racine	10-20 cm	$5,83 \times 10^{-6}$	36,75	0,22
6	<i>Phragmites</i>	Sans Racine	10-20 cm	$2,47 \times 10^{-6}$	22,30	0,00
1	<i>Typha</i>	Sans Racine	0-10 cm	$1,17 \times 10^{-6}$	39,29	1,09
3	<i>Typha</i>	Sans Racine	0-10 cm	$3,36 \times 10^{-6}$	32,19	0,08
4	<i>Typha</i>	Sans Racine	0-10 cm	$3,19 \times 10^{-6}$	41,28	0,02
5	<i>Typha</i>	Sans Racine	0-10 cm	$9,72 \times 10^{-6}$	31,23	0,00
6	<i>Typha</i>	Sans Racine	0-10 cm	$6,40 \times 10^{-6}$	41,77	0,70
1	<i>Typha</i>	Sans Racine	10-20 cm	$6,17 \times 10^{-7}$	23,14	0,60
3	<i>Typha</i>	Sans Racine	10-20 cm	$1,96 \times 10^{-6}$	19,73	0,00
4	<i>Typha</i>	Sans Racine	10-20 cm	$1,91 \times 10^{-6}$	32,38	0,00
5	<i>Typha</i>	Sans Racine	10-20 cm	$5,96 \times 10^{-6}$	21,85	0,00
6	<i>Typha</i>	Sans Racine	10-20 cm	$1,38 \times 10^{-6}$	24,08	0,08

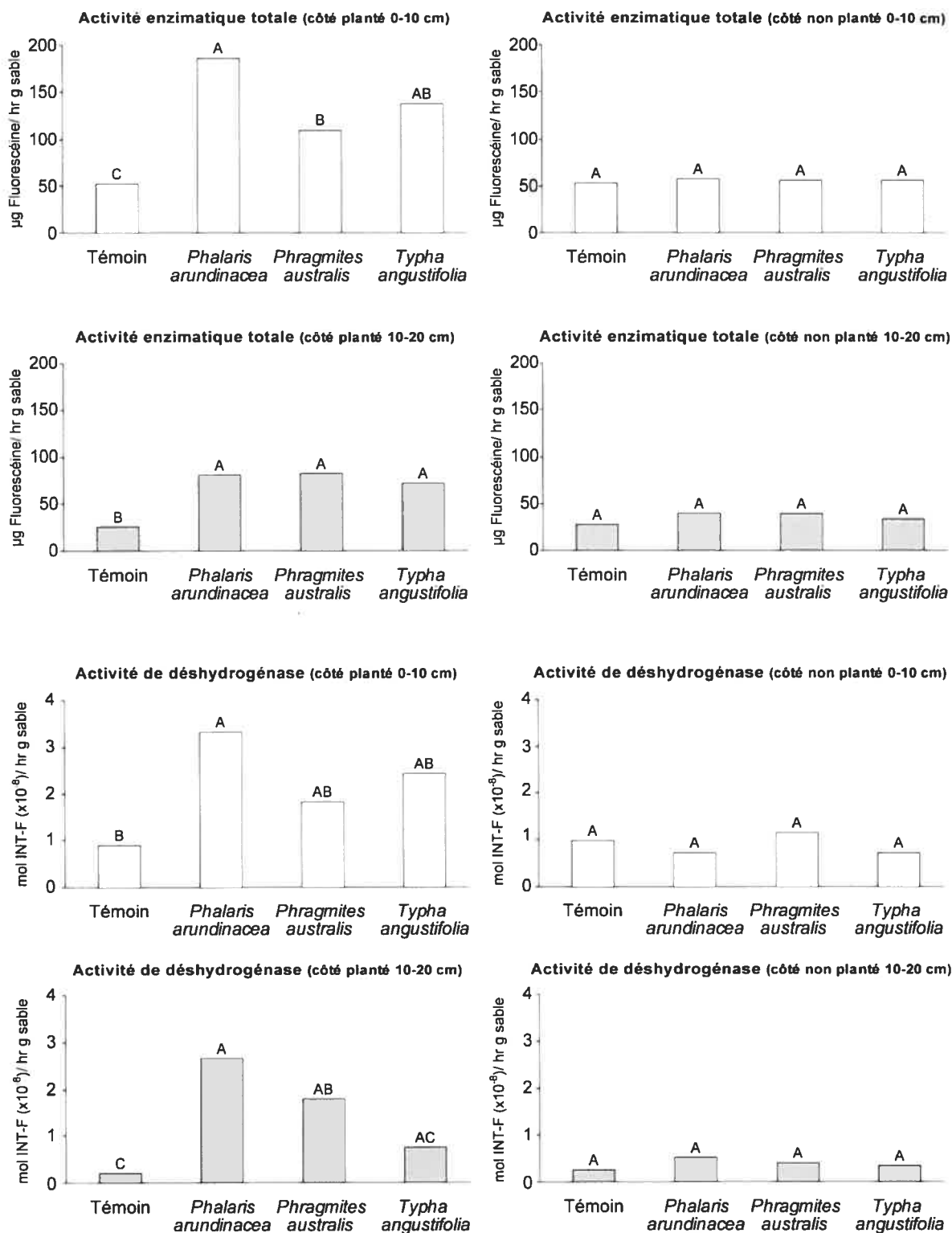


Figure A4.2: Activité enzymatique totale et déshydrogénase par masse de sable selon la zone (0-10 cm 10-20 cm) et la section du microcosme (côté planté et côté non planté) (A,B valeur significative  $P < 0.05$ ).

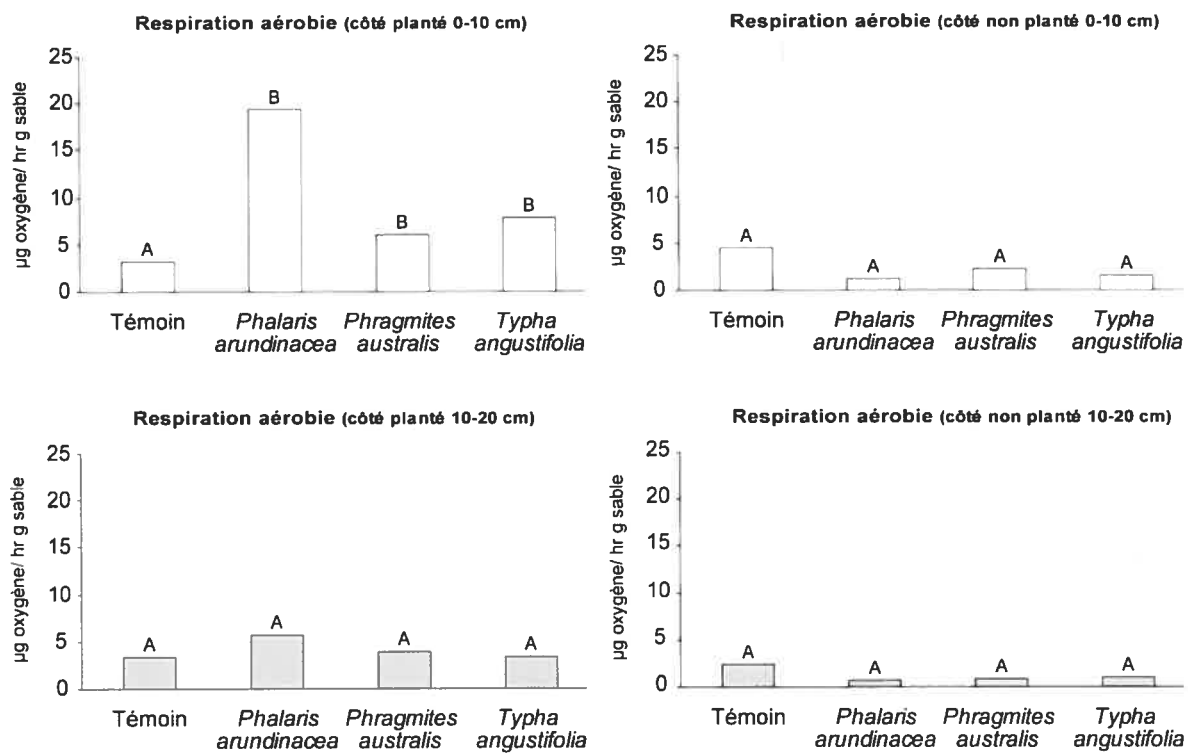


Figure A4.3: Respiration aérobie par masse de sable selon la zone (0-10 cm 10-20 cm) et la section du microcosme (côté planté et côté non planté) (A,B valeur significative  $P < 0.05$ ).



### A4.3 Localisation des microorganismes : Densité microbienne et protéines

Tableau A4.3.1 : Les résultats calculés de la section avec racine des microcosmes

Bloc	Espèces	Zone	Densité bactérienne	Protéine
			Bactérie zone <sup>-1</sup>	mg Prot zone <sup>-1</sup>
Non planté	0-10 cm	Sable	3,08 x 10 <sup>10</sup>	2,862
Non planté	0-10 cm	L. Inter.	5,73 x 10 <sup>6</sup>	0,363
Non planté	10-20 cm	Sable	9,44 x 10 <sup>9</sup>	1,604
Non planté	10-20 cm	L. Inter.	9,56 x 10 <sup>6</sup>	0,167
<i>Phalaris</i>	0-10 cm	Sable	1,76 x 10 <sup>11</sup>	7,510
<i>Phalaris</i>	0-10 cm	Racine	8,03 x 10 <sup>11</sup>	17,858
<i>Phalaris</i>	0-10 cm	L. Inter.	1,28 x 10 <sup>7</sup>	0,088
<i>Phalaris</i>	10-20 cm	Sable	1,04 x 10 <sup>11</sup>	7,014
<i>Phalaris</i>	10-20 cm	Racine	2,11 x 10 <sup>11</sup>	3,412
<i>Phalaris</i>	10-20 cm	L. Inter.	7,41 x 10 <sup>9</sup>	0,049
<i>Phragmites</i>	0-10 cm	Sable	6,31 x 10 <sup>10</sup>	7,248
<i>Phragmites</i>	0-10 cm	Racine	5,63 x 10 <sup>10</sup>	4,342
<i>Phragmites</i>	0-10 cm	L. Inter.	4,25 x 10 <sup>6</sup>	0,099
<i>Phragmites</i>	10-20 cm	Sable	3,91 x 10 <sup>10</sup>	5,062
<i>Phragmites</i>	10-20 cm	Racine	2,88 x 10 <sup>10</sup>	2,312
<i>Phragmites</i>	10-20 cm	L. Inter.	4,48 x 10 <sup>10</sup>	0,084
<i>Typha</i>	0-10 cm	Sable	9,94 x 10 <sup>10</sup>	10,141
<i>Typha</i>	0-10 cm	Racine	1,59 x 10 <sup>11</sup>	8,520
<i>Typha</i>	0-10 cm	L. Inter.	3,05 x 10 <sup>6</sup>	0,115
<i>Typha</i>	10-20 cm	Sable	4,93 x 10 <sup>10</sup>	6,084
<i>Typha</i>	10-20 cm	Racine	3,57 x 10 <sup>10</sup>	1,945
<i>Typha</i>	10-20 cm	L. Inter.	5,57 x 10 <sup>6</sup>	0,026

#### A4.4 Localisation des microorganismes : Activité enzymatique, déshydrogénase et taux de respiration aérobie

Tableau A3.4.1 : Les résultats calculés de la section avec racine des microcosmes

Bloc	Espèces	Zone	Activité de déshydrogénase mol INT-F hr <sup>-1</sup> zone <sup>-1</sup>	Activité enzymatique mg Fluo hr <sup>-1</sup> zone <sup>-1</sup>	Taux de respiration aérobie mg O <sub>2</sub> hr <sup>-1</sup> zone <sup>-1</sup>
Non planté	0-10 cm	Sable	2,97 x 10 <sup>-6</sup>	18,944	ND
Non planté	0-10 cm	L. Inter.	1,33 x 10 <sup>-7</sup>	6,834	ND
Non planté	10-20 cm	Sable	1,71 x 10 <sup>-6</sup>	14,270	ND
Non planté	10-20 cm	L. Inter.	2,35 x 10 <sup>-7</sup>	6,291	ND
<i>Phalaris</i>	0-10 cm	Sable	1,19 x 10 <sup>-5</sup>	67,411	2,714
<i>Phalaris</i>	0-10 cm	Racine	2,01 x 10 <sup>-5</sup>	58,400	10,016
<i>Phalaris</i>	0-10 cm	L. Inter.	1,12 x 10 <sup>-7</sup>	7,581	0,000
<i>Phalaris</i>	10-20 cm	Sable	1,18 x 10 <sup>-5</sup>	45,809	1,200
<i>Phalaris</i>	10-20 cm	Racine	8,59 x 10 <sup>-6</sup>	50,788	0,960
<i>Phalaris</i>	10-20 cm	L. Inter.	1,76 x 10 <sup>-7</sup>	7,371	0,020
<i>Phragmites</i>	0-10 cm	Sable	7,55 x 10 <sup>-6</sup>	63,800	1,610
<i>Phragmites</i>	0-10 cm	Racine	3,24 x 10 <sup>-6</sup>	52,188	2,232
<i>Phragmites</i>	0-10 cm	L. Inter.	7,55 x 10 <sup>-8</sup>	7,243	0,000
<i>Phragmites</i>	10-20 cm	Sable	7,76 x 10 <sup>-6</sup>	51,920	3,040
<i>Phragmites</i>	10-20 cm	Racine	1,88 x 10 <sup>-6</sup>	26,280	2,592
<i>Phragmites</i>	10-20 cm	L. Inter.	1,23 x 10 <sup>-7</sup>	7,295	0,021
<i>Typha</i>	0-10 cm	Sable	6,94 x 10 <sup>-6</sup>	63,181	1,805
<i>Typha</i>	0-10 cm	Racine	5,65 x 10 <sup>-6</sup>	57,566	5,368
<i>Typha</i>	0-10 cm	L. Inter.	3,01 x 10 <sup>-8</sup>	6,845	0,092
<i>Typha</i>	10-20 cm	Sable	4,00 x 10 <sup>-6</sup>	39,067	0,864
<i>Typha</i>	10-20 cm	Racine	2,11 x 10 <sup>-6</sup>	27,804	1,040
<i>Typha</i>	10-20 cm	L. Inter.	6,45 x 10 <sup>-8</sup>	6,765	0,184

#### A4.5 La biomasse souterraine et la surface racinaire

- **Biomasse souterraine** : =(Biomasse. Souterraine) Aucun calcul
- **Surface racinaire** : =(Biomasse. Souterraine. \* Ratio(surface/masse))
  - Biomasse. Souterraine: Biomasse totale des racines d'une espèce
  - Ratio(surface/masse) : Ratio de la surface racinaire d'un échantillon sur sa biomasse sèche

**Tableau A3.5.1 : Les résultats calculés de la section avec racine des microcosmes**

Bloc	Espèces	Zone	Biomasse souterraine	Surface racinaire
			(g)	(m <sup>2</sup> )
1	<i>Phalaris</i>	0-10 cm	10,37	0,71
2	<i>Phalaris</i>	0-10 cm	15,92	0,87
3	<i>Phalaris</i>	0-10 cm	10,93	0,64
4	<i>Phalaris</i>	0-10 cm	13,31	0,69
5	<i>Phalaris</i>	0-10 cm	4,96	0,31
6	<i>Phalaris</i>	0-10 cm	12,38	0,84
1	<i>Phalaris</i>	10-20 cm	1,43	0,19
2	<i>Phalaris</i>	10-20 cm	0,47	0,06
3	<i>Phalaris</i>	10-20 cm	0,42	0,00
4	<i>Phalaris</i>	10-20 cm	0,51	0,06
5	<i>Phalaris</i>	10-20 cm	0,89	0,12
6	<i>Phalaris</i>	10-20 cm	0,49	0,07
1	<i>Phragmites</i>	0-10 cm	4,56	0,22
2	<i>Phragmites</i>	0-10 cm	4,05	0,19
3	<i>Phragmites</i>	0-10 cm	1,97	0,11
4	<i>Phragmites</i>	0-10 cm	2,71	0,14
5	<i>Phragmites</i>	0-10 cm	6,00	0,37
6	<i>Phragmites</i>	0-10 cm	5,26	0,28
1	<i>Phragmites</i>	10-20 cm	2,46	0,18
2	<i>Phragmites</i>	10-20 cm	1,51	0,12
3	<i>Phragmites</i>	10-20 cm	0,50	0,06
4	<i>Phragmites</i>	10-20 cm	1,13	0,10
5	<i>Phragmites</i>	10-20 cm	1,47	0,12
6	<i>Phragmites</i>	10-20 cm	2,32	0,19
1	<i>Typha</i>	0-10 cm	25,26	0,26
2	<i>Typha</i>	0-10 cm	21,16	0,20
3	<i>Typha</i>	0-10 cm	12,91	0,13
4	<i>Typha</i>	0-10 cm	15,27	0,18
5	<i>Typha</i>	0-10 cm	21,01	0,28
6	<i>Typha</i>	0-10 cm	17,28	0,19
1	<i>Typha</i>	10-20 cm	1,67	0,09
2	<i>Typha</i>	10-20 cm	0,92	0,09
3	<i>Typha</i>	10-20 cm	0,17	0,02
4	<i>Typha</i>	10-20 cm	1,89	0,04
5	<i>Typha</i>	10-20 cm	1,48	0,07
6	<i>Typha</i>	10-20 cm	1,50	0,06

#### A4.6 Biomasse aérienne, nombre et hauteur de tiges

- **Biomasse aérienne** : =(Biomasse. Aérienne) Aucun calcul
- **Nombre de Tiges** : =(Nombre de tiges) Aucun calcul
- **Hauteur des tiges** : =(Hauteur des tiges) Aucun calcul

Tableau A3.6.1 : Les résultats calculés de la section avec racine des microcosmes

		<b>Biomasse aérienne</b>	<b>Nombre de. tiges</b>	<b>Hauteur des tiges</b>
<b>Bloc</b>	<b>Espèces</b>	<b>g</b>		<b>cm</b>
1	<i>Phalaris</i>	55,50	82	90
2	<i>Phalaris</i>	67,62	121	75
3	<i>Phalaris</i>	62,95	77	95
4	<i>Phalaris</i>	64,08	87	95
5	<i>Phalaris</i>	44,15	66	95
6	<i>Phalaris</i>	59,97	129	77
1	<i>Phragmites</i>	23,48	35	106
2	<i>Phragmites</i>	20,66	25	106
3	<i>Phragmites</i>	11,66	29	79
4	<i>Phragmites</i>	16,66	25	90
5	<i>Phragmites</i>	38,80	37	103
6	<i>Phragmites</i>	28,60	35	120
1	<i>Typha</i>	17,52	3	146
2	<i>Typha</i>	14,94	4	146
3	<i>Typha</i>	10,66	5	126
4	<i>Typha</i>	21,09	9	140
5	<i>Typha</i>	22,52	5	106
6	<i>Typha</i>	14,88	6	129

## Annexe 5 : Analyse de variance (ANOVA) et les comparaisons multiples de Tukey pour des différences entre les moyens

### Glossaire

bloc = Représente 4 microcosmes (3 espèces de plantes et un témoin)

esp = Espèce de plantes et le témoin

cote = Coté du microcosme (P = planté et NP= non planté)

prof=prof = Profondeur 10-20 cm

prof=surf = Profondeur 0-10 cm

### A5.1 Protéines

R-Square: 0.99

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
bloc	4	685,68	171,42	1,65	0,2368
esp	3	1148,91	382,97	3,70	0,0427
bloc*esp	12	1240,73	103,39	4,42	0,0166
cote	1	2026,99	2026,99	147,01	0,0003
bloc*cote	4	55,15	13,79	0,73	0,6037
esp*cote	3	929,97	309,99	13,58	0,0004
bloc*esp*cote	12	273,99	22,83	2,27	0,0849
prof	1	676,37	1676,37	103,45	0,0005
bloc*prof	4	64,82	16,20	2,44	0,3485
esp*prof	3	324,26	108,09	10,21	0,0013
bloc*esp*prof	12	127,06	10,59	1,05	0,465
cote*prof	1	775,95	775,95	127,36	0,0004
bloc*cote*prof	4	24,37	6,09	0,61	0,6659
esp*cote*prof	3	408,06	136,02	13,53	0,0004
Error	12	120,64	10,05		

----- cote=NP prof=prof -----				
Tukey Grouping	Mean	N	esp	
A	7.542	5	Phalaris	
A	7.308	5	Phagmite	
A	6.034	5	Témoin	
A	3.644	5	Typha	

----- cote=NP prof=surf -----				
Tukey Grouping	Mean	N	esp	
A	12.516	5	Phagmite	
A	8.586	5	Typha	
A	8.002	5	Phalaris	
A	7.130	5	Témoin	

----- cote=P prof=prof -----				
Tukey Grouping		Mean	N	esp
	A	14.258	5	Phagmite
	A	13.918	5	Phalaris
B	A	8.358	5	Typha
B		3.348	5	Temoin

----- cote=P prof=surf -----				
Tukey Grouping		Mean	N	esp
	A	39.578	5	Phalaris
B	A	29.748	5	Typha
B	C	21.538	5	Phagmite
	C	10.554	5	Temoin

----- esp=Phagmite cote=NP -----				
Tukey Grouping		Mean	N	prof
	A	12.516	5	surf
	A	7.308	5	prof

----- esp=Phagmite cote=P -----				
Tukey Grouping		Mean	N	prof
	A	21.538	5	surf
	A	14.258	5	prof

----- esp=Phalaris cote=NP -----				
Tukey Grouping		Mean	N	prof
	A	8.002	5	surf
	A	7.542	5	prof

----- esp=Phalaris cote=P -----				
Tukey Grouping		Mean	N	prof
	A	39.578	5	surf
	B	13.918	5	prof

----- esp=Temoin cote=NP -----				
Tukey Grouping		Mean	N	prof
	A	7.130	5	surf
	A	6.034	5	prof

----- esp=Temoin cote=P -----				
Tukey Grouping		Mean	N	prof
	A	10.554	5	surf
	B	3.348	5	prof

----- esp=Typha cote=NP -----				
Tukey Grouping		Mean	N	prof
	A	8.5860	5	surf
	B	3.6440	5	prof

----- esp=Typha cote=P -----				
Tukey Grouping		Mean	N	prof
	A	29.748	5	surf
	B	8.358	5	prof

```
----- esp=Phagmite prof=prof -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
                    A      14.258  5      P
                    B      7.308   5      NP
```

```
----- esp=Phagmite prof=surf -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
                    A      21.538  5      P
                    B      12.516  5      NP
```

```
----- esp=Phalaris prof=prof -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
                    A      13.918  5      P
                    B      7.542   5      NP
```

```
----- esp=Phalaris prof=surf -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
                    A      39.578  5      P
                    B      8.002   5      NP
```

```
----- esp=Temoin prof=prof -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
                    A      6.034   5      NP
                    A      3.348   5      P
```

```
----- esp=Temoin prof=surf -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
                    A      10.554  5      P
                    A      7.130   5      NP
```

```
----- esp=Typha prof=prof -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
                    A      8.3580  5      P
                    B      3.6440  5      NP
```

```
----- esp=Typha prof=surf -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
                    A      29.748  5      P
                    B      8.586   5      NP
```

## A5.2 Déshydrogénase

R-Square: 0.98

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
bloc	4	1454,03	363,51	2,75	0,0913
esp	3	1542,53	514,18	6,80	0,0063
bloc*esp	12	907,36	75,61	2,52	0,1274
cote	1	2413,29	2413,29	56,13	0,0017
bloc*cote	4	171,99	43,00	2,25	0,2789
esp*cote	3	1476,31	492,10	16,70	0,0001
bloc*esp*cote	12	353,70	29,47	1,44	0,2688
prof	1	816,58	816,58	15,26	0,0174
bloc*prof	4	214,07	53,52	5,05	0,2865
esp*prof	3	133,15	44,38	2,12	0,1513
bloc*esp*prof	12	251,52	20,96	1,02	0,4841
cote*prof	1	28,55	28,55	2,82	0,1682
bloc*cote*prof	4	40,46	10,11	0,49	0,7406
esp*cote*prof	3	253,67	84,56	4,13	0,0316
Error	12	245,68	20,47		

----- cote=NP prof=prof -----

Tukey Grouping	Mean	N	esp
A	5.106	5	Phalaris
A	4.160	5	Phagmite
A	3.300	5	Typha
A	2.448	5	Temoin

----- cote=NP prof=surf -----

Tukey Grouping	Mean	N	esp
A	11.454	5	Phagmite
A	9.634	5	Temoin
A	7.562	5	Typha
A	7.144	5	Phalaris

----- cote=P prof=prof -----

Tukey Grouping	Mean	N	esp
A	26.308	5	Phalaris
B A	18.078	5	Phagmite
B C	7.644	5	Typha
C	2.144	5	Temoin

----- cote=P prof=surf -----

Tukey Grouping	Mean	N	esp
A	33.406	5	Phalaris
B A	24.050	5	Typha
B A	18.124	5	Phagmite
B	8.932	5	Temoin



```
----- esp=Phagmite cote=NP -----
Tukey Grouping      Mean      N      prof
                    A      11.454  5      surf
                    A      4.160   5      prof
```

```
----- esp=Phagmite cote=P -----
Tukey Grouping      Mean      N      prof
                    A      18.124  5      surf
                    A      18.078  5      prof
```

```
----- esp=Phalaris cote=NP -----
Tukey Grouping      Mean      N      prof
                    A      7.144   5      surf
                    A      5.106   5      prof
```

```
----- esp=Phalaris cote=P -----
Tukey Grouping      Mean      N      prof
                    A      33.406  5      surf
                    A      26.308  5      prof
```

```
----- esp=Temoin cote=NP -----
Tukey Grouping      Mean      N      prof
                    A      9.634   5      surf
                    B      2.448   5      prof
```

```
----- esp=Temoin cote=P -----
Tukey Grouping      Mean      N      prof
                    A      8.932   5      surf
                    A      2.144   5      prof
```

```
----- esp=Typha cote=NP -----
Tukey Grouping      Mean      N      prof
                    A      7.562   5      surf
                    A      3.300   5      prof
```

```
----- esp=Typha cote=P -----
Tukey Grouping      Mean      N      prof
                    A      24.050  5      surf
                    B      7.644   5      prof
```

```
----- esp=Phagmite prof=prof -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
      A          18.078    5      P
      A           4.160    5      NP
```

```
----- esp=Phagmite prof=surf -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
      A          18.124    5      P
      B          11.454    5      NP
```

```
----- esp=Phalaris prof=prof -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
      A          26.308    5      P
      B           5.106    5      NP
```

```
----- esp=Phalaris prof=surf -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
      A          33.406    5      P
      B           7.144    5      NP
```

```
----- esp=Temoin prof=prof -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
      A           2.4480    5      NP
      A           2.1440    5      P
```

```
----- esp=Temoin prof=surf -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
      A           9.634     5      NP
      A           8.932     5      P
```

```
----- esp=Typha prof=prof -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
      A           7.644     5      P
      B           3.300     5      NP
```

```
----- esp=Typha prof=surf -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
      A          24.050    5      P
      B           7.562    5      NP
```

### A5.3 Activité enzymatique totale

R-Square: 0.99

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
bloc	4	3070,10	767,52	2,18	0,3804
esp	3	27047,00	9015,78	12,72	0,0005
bloc*esp	12	8505,58	708,80	1,45	0,2603
cote	1	46048,00	46048,00	194,34	0,0002
bloc*cote	4	947,80	236,95	0,52	0,7255
esp*cote	3	19962,00	6654,00	15,33	0,0002
bloc*esp*cote	12	5209,33	434,11	4,17	0,0099
prof	1	28625,00	28625,00	1125,50	<,0001
bloc*prof	4	101,73	25,43	0,14	0,9607
esp*prof	3	5207,81	1735,94	10,84	0,001
bloc*esp*prof	12	1920,82	160,07	1,54	0,2337
cote*prof	1	6197,14	6197,14	48,25	0,0023
bloc*cote*prof	4	513,72	128,43	1,23	0,348
esp*cote*prof	3	5786,66	1928,89	18,53	<,0001
Error	12	1249,47	104,12		

----- cote=NP prof=prof -----				
Tukey Grouping	Mean	N	esp	
A	39.304	5	Phagmite	
A	38.888	5	Phalaris	
A	34.208	5	Typha	
A	28.346	5	Temoin	

----- cote=NP prof=surf -----				
Tukey Grouping	Mean	N	esp	
A	56.720	5	Phalaris	
A	56.366	5	Typha	
A	55.504	5	Phagmite	
A	53.072	5	Temoin	

----- cote=P prof=prof -----				
Tukey Grouping	Mean	N	esp	
A	83.11	5	Phagmite	
A	80.57	5	Phalaris	
A	72.26	5	Typha	
B	26.33	5	Temoin	

----- cote=P prof=surf -----				
Tukey Grouping	Mean	N	esp	
A	185.90	5	Phalaris	
B	137.30	5	Typha	
B	108.89	5	Phagmite	
C	51.92	5	Temoin	

```
----- esp=Phagmite cote=NP -----
Tukey Grouping      Mean      N      prof
                    A      55.504   5      surf
                    B      39.304   5      prof
```

```
----- esp=Phagmite cote=P -----
Tukey Grouping      Mean      N      prof
                    A      108.89   5      surf
                    A      83.11    5      prof
```

```
----- esp=Phalaris cote=NP -----
Tukey Grouping      Mean      N      prof
                    A      56.720   5      surf
                    B      38.888   5      prof
```

```
----- esp=Phalaris cote=P -----
Tukey Grouping      Mean      N      prof
                    A      185.900  5      surf
                    B      80.572   5      prof
```

```
----- esp=Temoin cote=NP -----
Tukey Grouping      Mean      N      prof
                    A      53.072   5      surf
                    B      28.346   5      prof
```

```
----- esp=Temoin cote=P -----
Tukey Grouping      Mean      N      prof
                    A      51.918   5      surf
                    B      26.326   5      prof
```

```
----- esp=Typha cote=NP -----
Tukey Grouping      Mean      N      prof
                    A      56.366   5      surf
                    B      34.208   5      prof
```

```
----- esp=Typha cote=P -----
Tukey Grouping      Mean      N      prof
                    A      137.298  5      surf
                    B      72.256   5      prof
```

----- esp=Phragmite prof=prof -----

Tukey Grouping	Mean	N	cote
A	83.11	5	P
B	39.30	5	NP

----- esp=Phragmite prof=surf -----

Tukey Grouping	Mean	N	cote
A	108.89	5	P
B	55.50	5	NP

----- esp=Phalaris prof=prof -----

Tukey Grouping	Mean	N	cote
A	80.572	5	P
B	38.888	5	NP

----- esp=Phalaris prof=surf -----

Tukey Grouping	Mean	N	cote
A	185.90	5	P
B	56.72	5	NP

----- esp=Temoin prof=prof -----

Tukey Grouping	Mean	N	cote
A	28.346	5	NP
A	26.326	5	P

----- esp=Temoin prof=surf -----

Tukey Grouping	Mean	N	cote
A	53.072	5	NP
A	51.918	5	P

----- esp=Typha prof=prof -----

Tukey Grouping	Mean	N	cote
A	72.256	5	P
B	34.208	5	NP

----- esp=Typha prof=surf -----

Tukey Grouping	Mean	N	cote
A	137.30	5	P
B	56.37	5	NP

## A5.4 Taux de respiration aérobie

R-Square: 0.97

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
bloc	4	51,56	12,89	1,34	0.4320
esp	3	178,22	59,41	4,11	0.0320
bloc*esp	12	173,41	14,45	2,09	0.1970
cote	1	471,61	471,61	508,92	<.0001
bloc*cote	4	3,71	0,93	0,24	0.8914
esp*cote	3	363,62	121,21	21,14	<.0001
bloc*esp*cote	12	68,79	5,73	1,09	0.4405
prof	1	194,69	194,69	43,56	0.0027
bloc*prof	4	17,88	4,47	0,99	0.5420
esp*prof	3	122,00	40,67	6,31	0.0082
bloc*esp*prof	12	77,30	6,44	1,23	0.3642
cote*prof	1	81,85	81,85	24,76	0.0076
bloc*cote*prof	4	13,23	3,31	0,63	0.6505
esp*cote*prof	3	169,94	56,65	10,79	0.0010
Error	12	62,98	5,25		

----- cote=NP prof=prof -----

Tukey Grouping	Mean	N	esp
A	2.4880	5	Temoin
A	0.9820	5	Typha
A	0.7640	5	Phagmite
A	0.7100	5	Phalaris

----- cote=NP prof=surf -----

Tukey Grouping	Mean	N	esp
A	4.380	5	Temoin
A	2.138	5	Phagmite
A	1.558	5	Typha
A	1.256	5	Phalaris

----- cote=P prof=prof -----

Tukey Grouping	Mean	N	esp
A	5.606	5	Phalaris
A	3.984	5	Phagmite
A	3.354	5	Typha
A	3.332	5	Temoin

----- cote=P prof=surf -----

Tukey Grouping	Mean	N	esp
A	19.606	5	Phalaris
B	7.920	5	Typha
B	6.090	5	Phagmite
B	3.232	5	Temoin

```

----- esp=Phragmite cote=NP -----
Tukey Grouping      Mean      N      prof
                   A      2.1380   5      surf
                   A      0.7640   5      prof

----- esp=Phragmite cote=P -----
Tukey Grouping      Mean      N      prof
                   A      6.090    5      surf
                   A      3.984    5      prof

----- esp=Phalaris cote=NP -----
Tukey Grouping      Mean      N      prof
                   A      1.2560   5      surf
                   A      0.7100   5      prof

----- esp=Phalaris cote=P -----
--
Tukey Grouping      Mean      N      prof
                   A      19.606   5      surf
                   B      5.606    5      prof

----- esp=Temoin cote=NP -----
Tukey Grouping      Mean      N      prof
                   A      4.3800   5      surf
                   B      2.4880   5      prof

----- esp=Temoin cote=P -----
Tukey Grouping      Mean      N      prof
                   A      3.3320   5      prof
                   A      3.2320   5      surf

----- esp=Typha cote=NP -----
Tukey Grouping      Mean      N      prof
                   A      1.5580   5      surf
                   B      0.9820   5      prof

----- esp=Typha cote=P -----
Tukey Grouping      Mean      N      prof
                   A      7.920    5      surf
                   B      3.354    5      prof

```

```

----- esp=Phagmite prof=prof -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
                    A      3.9840  5      P
                    B      0.7640  5      NP

----- esp=Phagmite prof=surf -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
                    A      6.090   5      P
                    A      2.138   5      NP

----- esp=Phalaris prof=prof -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
                    A      5.6060  5      P
                    B      0.7100  5      NP

----- esp=Phalaris prof=surf -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
                    A      19.606  5      P
                    B      1.256   5      NP

----- esp=Temoin prof=prof -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
                    A      3.3320  5      P
                    A      2.4880  5      NP

----- esp=Temoin prof=surf -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
                    A      4.3800  5      NP
                    A      3.2320  5      P

----- esp=Typha prof=prof -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
                    A      3.3540  5      P
                    B      0.9820  5      NP

----- esp=Typha prof=surf -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
                    A      7.920   5      P
                    B      1.558   5      NP

```



### A5.5 Densité de bactéries

R-Square: 0.98

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
bloc	3	4018,47	1339,49	1,03	0,6302
esp	3	153820,00	51273,00	45,79	<,0001
bloc*esp	9	10078,00	1119,73	1,51	0,5722
cote	1	122364,00	122364,00	166,23	0,001
bloc*cote	3	2208,31	736,10	1,05	0,6778
esp*cote	3	134108,00	44703,00	43,23	<,0001
bloc*esp*cote	9	9307,17	1034,13	0,65	0,7326
prof	1	61608,00	61608,00	42,90	0,0072
bloc*prof	3	4308,59	1436,20	1,50	0,5376
esp*prof	3	49399,00	16466,00	12,76	0,0014
bloc*esp*prof	9	11618,00	1290,85	0,81	0,6176
cote*prof	1	35219,00	35219,00	28,09	0,0131
bloc*cote*prof	3	3762,05	1254,02	0,79	0,5287
esp*cote*prof	3	46651,00	15550,00	9,81	0,0034
Error	9	14264,47	1584,94		

----- cote=NP prof=prof -----

Tukey Grouping	Mean	N	esp
A	19.238	4	Phalaris
A	16.700	4	Phagmite
A	13.128	4	Temoin
A	9.965	4	Typha

----- cote=NP prof=surf -----

Tukey Grouping	Mean	N	esp
A	38.075	4	Phalaris
A	30.743	4	Phagmite
A	30.045	4	Temoin
A	20.710	4	Typha

----- cote=P prof=prof -----

Tukey Grouping	Mean	N	esp
A	120.15	4	Phalaris
B A	55.53	4	Phagmite
B	38.29	4	Typha
B	7.20	4	Temoin

----- cote=P prof=surf -----

Tukey Grouping	Mean	N	esp
A	413.57	4	Phalaris
B	121.72	4	Typha
B	103.55	4	Phagmite
B	18.21	4	Temoin

----- esp=Phragmite cote=NP -----				
Tukey Grouping	Mean	N	prof	
A	30.74	4	surf	
A	16.70	4	prof	
----- esp=Phragmite cote=P -----				
Tukey Grouping	Mean	N	prof	
A	103.55	4	surf	
A	55.53	4	prof	
----- esp=Phalaris cote=NP -----				
Tukey Grouping	Mean	N	prof	
A	38.075	4	surf	
A	19.238	4	prof	
----- esp=Phalaris cote=P -----				
Tukey Grouping	Mean	N	prof	
A	413.57	4	surf	
B	120.15	4	prof	
----- esp=Temoin cote=NP -----				
Tukey Grouping	Mean	N	prof	
A	30.045	4	surf	
A	13.128	4	prof	
----- esp=Temoin cote=P -----				
Tukey Grouping	Mean	N	prof	
A	18.205	4	surf	
B	7.195	4	prof	
----- esp=Typha cote=NP -----				
Tukey Grouping	Mean	N	prof	
A	20.710	4	surf	
A	9.965	4	prof	
----- esp=Typha cote=P -----				
Tukey Grouping	Mean	N	prof	
A	121.72	4	surf	
B	38.29	4	prof	

```
----- esp=Phragmite prof=prof -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
A                   55.53     4      P
A                   16.70     4      NP
```

```
----- esp=Phragmite prof=surf -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
A                   103.55    4      P
A                   30.74     4      NP
```

```
----- esp=Phalaris prof=prof -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
A                   120.15    4      P
A                   19.24     4      NP
```

```
----- esp=Phalaris prof=surf -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
A                   413.57    4      P
B                   38.08     4      NP
```

```
----- esp=Temoin prof=prof -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
A                   13.128    4      NP
A                   7.195     4      P
```

```
----- esp=Temoin prof=surf -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
A                   30.045    4      NP
A                   18.205    4      P
```

```
----- esp=Typha prof=prof -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
A                   38.293    4      P
A                   9.965     4      NP
```

```
----- esp=Typha prof=surf -----
Tukey Grouping      Mean      N      cote
A                   121.72    4      P
B                   20.71     4      NP
```

